

**Untersuchungen zum Abbau
der peroxisomalen Alkohol-Oxidase
in *Candida boidinii***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christiane Bormann
aus Bad Nenndorf

1980

Untersuchungen zum Abbau
der peroxisomalen Alkohol-Oxidase
in **Candida boidinii**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christiane Bormann
aus Bad Nenndorf

1980



Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sahm

Korreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1980

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich GmbH ausgeführt. Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, seine zahlreichen Anregungen und die großzügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eggeling und Herrn Dr. Schimz für die Betreuung der Experimente und viele anregende Diskussionen.

Herrn Wengler danke ich für die gaschromatographischen Untersuchungen sowie allen Mitarbeitern des Instituts, die mir behilflich waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen benutzt:

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-äthylbenzthiazolin-sulfonat (6))
AOD	Alkohol-Oxidase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BTPNA	N-Benzoyl-L-Tyrosin-p-Nitroanilid
CCCP	Carbonylcyanid m-Chlorphenylhydrazon
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DMAE	Dimethylaminoäthanol
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinucleotid
NAD(P)	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid(phosphat)
NSA	Nonenylbernsteinsäureanhydrid
PA	Polyacrylamid
PCMB	4-Hydroxymercuribenzoessäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TRIS	Tris(hydroxyl)aminomethan

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	8
1. Versuchsorganismus	8
2. Chemikalien und Materialien	8
3. Nährmedien und Kulturbedingungen	10
4. Elektronenmikroskopische Methoden	12
5. Herstellung der Rohextrakte	13
6. Aktivierung der Proteasen im Rohextrakt	14
7. Bestimmung von Enzymaktivitäten	15
8. Weitere Bestimmungsmethoden	19
9. Isolierung der Alkohol-Oxidase	21
10. Anreicherung der Proteasen	21
11. Analytische Disc-Elektrophorese	22
12. Analytische Elektrofokussierung	23
13. Immunologische Methoden	24
III. Ergebnisse	28
1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Abbau der Peroxisomen	28
2. In vivo Versuche zur Inaktivierung der Alkohol-Oxidase und Katalase	34
3. Untersuchung des Alkohol-Oxidase Proteins während der Inaktivierung	40
4. Untersuchungen zum proteolytischen System	50
5. In vitro Versuche zur proteolytischen Inaktivierung von Alkohol-Oxidase und Katalase	65
IV. Diskussion	73
V. Zusammenfassung	82
VI. Literaturverzeichnis	84

I. EINLEITUNG

Die lebende Zelle vermag durch Regulationsmechanismen ihren Stoffwechsel ökonomisch an sich verändernde Milieubedingungen anzupassen. Die Adaptation kann auf zwei verschiedenen Ebenen erfolgen: durch Kontrolle der Enzymmenge und durch Kontrolle der Enzymaktivität. Der Regulation der Enzymmenge durch Veränderung der Syntheseraten (Frisch, 1961) sowie der Modifikation der Enzymaktivität durch kovalente (Holzer und Duntze, 1971) und nicht kovalente Bindung (allosterische Enzyme; Stadtman, 1966) wurde lange Zeit intensive Forschung gewidmet. Dagegen wurde erst in den letzten Jahren der Kontrolle des Enzymabbaus und der Rolle der proteolytischen Enzyme bei der Regulation zellulärer Prozesse mehr Aufmerksamkeit entgegengebracht, obwohl schon seit den Studien von Schoenheimer (1942) bekannt ist, daß die intrazellulären Proteinkonzentrationen das Resultat eines dynamischen Gleichgewichts von Proteinsynthese und Proteinabbau sind.

So hat man festgestellt, daß die Abbauraten für verschiedene Enzyme und Strukturproteine einer Zelle recht unterschiedlich sind (Pine, 1965, 1972; Rechcigl, 1971) und in Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen, wie z.B. Nährstoffbegrenzung, Hormonzugabe, Temperatur und Wachstumsphase variieren (Schimke und Doyle, 1970; Goldberg und John, 1976). Bei den meisten Organismen erfolgt unter Nahrungsmangelbedingungen eine starke Stimulation des Proteinabbaus. Durch den Abbau nicht mehr benötigter Proteine werden Energie und Aminosäuren für die Synthese neuer Proteine bereit gestellt (Wolf und Holzer, 1979). Dementsprechend ist in Bakterien- und Hefe-Zellen der Proteinabbau in der stationären Wachstumsphase gegenüber der logarithmischen Phase (Pine, 1966; Mandelstam, 1963; Halvorson, 1958 a, b; López und Gancedo, 1979) und wäh-

rend des Differenzierungsprozesses der Sporulation (Pine, 1972; Klar und Halvorson, 1975; Betz und Weiser, 1976) signifikant erhöht. Mit dem hohen Proteinabbau geht ein starker Anstieg der proteolytischen Enzymaktivitäten einher (Saheki und Holzer, 1975; Betz und Weiser, 1976; Hansen et al., 1977).

Neben dem generellen Turnover von Proteinen sind Proteasen an spezifischen Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgängen von Enzymen beteiligt und dadurch unmittelbar regulatorisch wirksam. Eine Reihe von Enzymen wird in inaktiver Form als Proenzym (Zymogen) synthetisiert und bei Bedarf durch irreversible, 'limitierte' Proteolyse in die biologisch aktive Form überführt. Solche Aktivierungen sind beispielsweise von den Verdauungsenzymen und den an der Blutkoagulation beteiligten Enzymen in Säugetieren, den β -Amylasen in Graskaryopsen und der Chitin-Synthetase in Hefen bekannt (Cunningham, 1965; Davie et al., 1979; Thoma et al., 1971; Cabib und Farkas, 1971).

Die selektive proteolytische Inaktivierung von Enzymen stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus bei der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen dar (Holzer et al., 1975; Switzer, 1977). Zumeist sind davon Enzyme betroffen, die am Anfang einer Stoffwechselkette oder an wichtigen Verzweigungspunkten stehen. Einige Beispiele sind in Tab. 1 angegeben. Es ist bisher unbekannt, ob zuerst eine Inaktivierung des Enzyms erfolgt und anschließend Proteolyse des inaktiven Enzymproteins, oder aber 'limitierte' Proteolyse selbst der erste Schritt zur Inaktivierung ist. Für die durch Glucose induzierten, irreversiblen Enzyminaktivierungen wurde in Analogie zur Katabolit-Repression der Begriff 'Katabolit-Inaktivierung' eingeführt (Holzer, 1976). Einige davon betroffene Enzyme bzw. Enzymsysteme in *Saccharomyces cerevisiae* sind: das Galactose-Aufnahme System (Spiegelmann und Reiner, 1947; Matern und Holzer, 1977),

Inaktiviertes Enzym	Organismus	Kulturbedingungen, die Inaktivierung auslösen	Literatur
Glutamat-Dehydrogenase NADPH-abhängig	<i>Candida utilis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	Übertragung dereprimierter Zellen auf Medien ohne Glucose	Hemmings (1978) Mazón (1978), Bogóñez et al. (1979) Hynes (1974), Kinghorn und Pate (1974)
Glutamin-Synthetase	<i>Candida utilis</i>	Zugabe von Ammonium, Glucose Verbrauch	Ferguson und Sims (1974)
Nitrat-Reduktase	<i>Neurospora crassa</i> <i>Ustilago maydis</i>	Übertragung von einem nitrathaltigen Medium in ein Medium ohne Nitrat Zugabe von Ammonium zu Nitrat angezogenen Zellen	Sorger et al. (1974) Lewis und Fincham (1970)
Phosphatase	<i>Euglena gracilis</i>	Zugabe von Phosphat zu dereprimierten Zellen	Liedtke und Ohmann (1969)
Glycogen-Phosphorylase	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Nahrungsmangel (Differenzierung)	Thomas und Wright (1976)

Tab. 1: Beispiele für Enzyminaktivierungen bei Algen und Pilzen, an denen Proteolyse beteiligt ist (zusammengestellt nach Wolf, 1980 a)

α -Glucosid(Maltose)-Permease (Robertson und Halvorson, 1957; Görts, 1969),
cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase (Ferguson et al., 1967),
Fructose-1,6-bisphosphatase (Gancedo, 1971),
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Haarasilta und Oura, 1975; Gancedo und Schwerzmann, 1976),
 α -Isopropyl-Malat-Synthetase (Brown et al., 1975) und die
Uridin-Nucleosidase (Magni et al., 1977).
Einige dieser Enzyme zeigen in vitro eine hohe Sensitivität gegenüber Proteasen (Neeff, 1974; Jušić et al., 1976; Molano und Gancedo, 1974; Magni et al., 1978). Im Fall der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase konnte mit Hilfe immunologischer Methoden ein proteolytischer Abbau des Enzyms nachgewiesen werden (Neeff et al., 1978).

Weitgehend ungeklärt ist bisher, wie die Kontrolle des Proteinabbaus beim Vorhandensein weniger (zumindest bis jetzt bekannter), meist unspezifisch arbeitender Proteasen zustande kommt. Denn es ist offensichtlich, daß die Kontrolle der intrazellulären Proteasespiegel nur einen Teil des Regulationssystems darstellt. Weitere Möglichkeiten einer Regulation der Proteolyse könnten bestehen in der

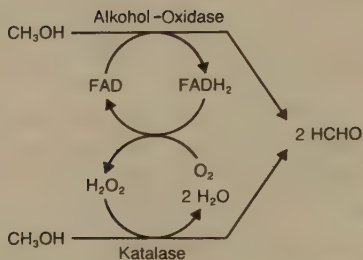
- 1.) Veränderung der Zugänglichkeit eines Proteins für Proteasen; zum Beispiel durch Änderung des Nettoladungszustands oder der Hydrophobität, durch kovalente Modifikation, durch Abdissoziation eines Coenzym oder eines spezifischen Metaboliten oder durch Ablösung von Membranen oder anderen schützenden Strukturen (Grisolia, 1964; Goldberg und Dice, 1974; Goldberg und John, 1976; Ballard, 1977; Bohley und Riemann, 1977; Holzer und Heinrich, 1980).
- 2.) Wechselwirkung zwischen Proteasen und Protease-Inhibitoren (Holzer, 1978; Wolf und Holzer, 1979; Kahl, 1979). So besteht eine Modellvorstellung, daß die

Proteasen als inaktive Enzym-Inhibitor-Komplexe im Cytoplasma vorliegen und auf ein physiologisches Signal hin die Dissoziation dieser Komplexe freie Proteasen für spezifische intrazelluläre Prozesse ergibt. In vitro Versuche mit dem Carboxypeptidase Y-Inhibitor-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, daß als Substrat eingesetzte Peptide eine Dissoziation des Inhibitor-Proteins von der Carboxypeptidase Y bewirken können, und dieser Dissoziationsgrad sehr unterschiedlich sein kann (Barth et al., 1978). Somit könnte der intrazelluläre Inhibitor als ein die Spezifität der Carboxypeptidase Y erhöhender Modulator betrachtet werden.

- 3.) Lokalisation der Proteasen und deren Substrate in verschiedenen Zellkompartimenten (De Duve und Wattiaux, 1966; Matile und Wiemken, 1967).

Die möglichen Kontrollmechanismen des proteolytischen Abbaus sind somit recht vielfältig und in vitro experimentell schwer zugänglich.

Die methylotrophe Hefe *Candida boidinii* (Sahm und Wagner, 1972) bildet während des Wachstums auf Methanol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle eine große Menge Alkohol-Oxidase (ca. 10 % des löslichen Zellproteins), die in Form kristalloider Einschlüsse zusammen mit Katalase in den Peroxisomen lokalisiert ist (Sahm, 1977). Alkohol-Oxidase und Katalase sind Schlüsselenzyme des Methanol-Stoffwechsels. Sie katalysieren kooperativ die Oxidation des Methanols zu Formaldehyd, indem das bei der Alkohol-Oxidase-Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid von der Katalase peroxidativ mit Methanol zu Formaldehyd und H_2O umgesetzt wird (Roggenkamp et al., 1974; Fujii und Tonumura, 1975; van Dijken et al., 1975 a):



Die Alkohol-Oxidase wurde aus einigen Methanol-verwertenden Hefen isoliert und charakterisiert (Tani et al., 1972; Sahm und Wagner, 1973 a; Kato et al., 1976). Es wurde ein Molekulargewicht von 600 000 - 670 000 und FAD als prosthetische Gruppe bestimmt. Das Enzym ist aus acht identischen Untereinheiten aufgebaut, die sich in Form zweier Tetraden direkt gegenüberliegen. Die Alkohol-Oxidase ist ein äußerst säureempfindliches Enzym; bei pH-Werten < 7.5 tritt irreversible Inaktivierung ein. Das pH-Optimum für die Enzymaktivität liegt bei 7.5 - 9.5.

Auf der Stufe des bei der Methanol-Oxidation entstehenden Formaldehyds erfolgt in methylotrophen Hefen die Aufgabelung in dissimilatorischen und assimilatorischen Stoffwechsel. Die Oxidation des Formaldehyds zu Kohlendioxyd wird von den NAD-abhängigen Enzymen Formaldehyd-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase katalysiert (Schütte et al., 1976), die im Cytoplasma lokalisiert sind (Sahm et al., 1975; Tanaka et al., 1976). Die Assimilation erfolgt über den erst kürzlich beschriebenen Dihydroxyaceton-Weg (van Dijken et al., 1978; Babel und Loffhagen, 1979; O'Connor und Quayle, 1979); dabei wird Formaldehyd über eine Transketolase-Reaktion auf ein Glycolfragment aus dem C_5 -Zucker Xylose 5-Phosphat übertragen (Kato et al., 1979; Waites und Quayle, 1980). Die Lokalisation der drei Schlüsselenzyme dieses Assimilationsweges - Transketolase, Triokinase und Fructose-1,6-bisphosphatase - ist bisher noch ungeklärt.

Die Bildung der Peroxisomen und der darin lokalisierten Enzyme Alkohol-Oxidase und Katalase wird durch Methanol induziert. Eine Methanol-Zelle der späten exponentiellen Phase enthält durchschnittlich 5 - 6 dicht zusammenliegende, kugelförmige Peroxisomen mit einem Durchmesser von 0.7 - 1.0 μm . Sie sind von einer einfachen Membran umgeben und somit morphologisch als Mikrobodies zu bezeichnen (van Dijken et al., 1975 b; Fukui et al., 1975; Sahm et al., 1975). Demgegenüber sind in Äthanol-Zellen keine Peroxisomen und in Glucose-Zellen nur kleine Peroxisomen (0.2 - 0.4 μm Durchmesser) nachweisbar (Roggenkamp, 1976). Ebenso werden während des Wachstums auf Äthanol und Glucose keine Alkohol-Oxidase und nur 1/5 der Katalase-Aktivität gebildet (Sahm, 1977).

Aus ersten Untersuchungen konnte geschlossen werden (Bormann, 1977), daß eine irreversible Inaktivierung von Alkohol-Oxidase und Katalase stattfindet, wenn Methanol-Zellen auf ein Medium mit Äthanol als Kohlenstoffquelle übertragen werden; parallel dazu erfolgte ein Abbau der Peroxisomen. Demgegenüber wurden die im Cytoplasma lokalisierten, dissimilatorischen Methanol-Enzyme Formaldehyd-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase nicht inaktiviert, sondern lediglich in der Synthese reprimiert. Diese Ergebnisse ließen einen selektiven proteolytischen Abbau der Peroxisomen und der darin lokalisierten Enzyme vermuten.

Die große Menge an Alkohol-Oxidase und ihre Lokalisation in Peroxisomen ließen es lohnenswert erscheinen, die Inaktivierung dieses Enzyms und den Mechanismus des Proteinabbaus in *Candida boidinii* zu untersuchen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsorganismus

In dieser Arbeit wurde die fakultativ methylotrophe Hefe *Candida boidinii* (ATCC 32 195) (Sahm und Wagner, 1972) als Versuchsorganismus verwendet.

2. Chemikalien und Materialien

Außer den nachfolgend aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Substanzen der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

a) Chemikalien für Nährmedien

Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Hefe-Extrakt	"
Malz-Extrakt	"

b) Chemikalien für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Dimethylaminoäthanol	Serva, Heidelberg
Glutaraldehyd	"
Nonenylbernsteinsäureanhydrid	"
Polyglykol diepoxid (D.E.R. 732)	"
Propylenoxid	"
Vinylcyclohexen dioxid (ERL-4206)	"

c) Chemikalien für Enzymtests

2,2'-Azino-di-(3-äthylbenz- thiazolin-sulfonat (6))	Boehringer, Mannheim
Azocoll	Calbiochem, San Diego, USA
N-Benzoyl-L-Tyrosin-p- Nitroanilid	Paesel, Frankfurt

Casein - Yellow	Calbiochem, San Diego, USA
Glutathion, reduziert	Boehringer, Mannheim
ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid "	
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Peroxidase	Boehringer, Mannheim

d) Chemikalien für die Gelelektrophorese

Acrylamid	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Ammoniumpersulfat	"
N,N'-Methylen-bis- acrylamid	"
N,N,N',N'-Tetramethyl- äthylendiamin	"

e) Weitere Chemikalien und Materialien

Agar Purified für Immundiffusion	Difco Laboratories, Detroit, USA
Ampholine PAGplate, pH Bereich 3.5 - 9.5	LKB, Stockholm, Schweden
Beem-Einbettungskapseln	Balzers Union AG, Liechtenstein
Carbonylcyanid m-Chlorphenyl- hydrazon	Sigma, St. Louis, USA
DEAE-Cellulose DE 32	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Diaflo-Membranen PM 10 und XM 100 A	Amicon, Massachusetts, USA
DL - Dithiothreitol	Sigma, St. Louis, USA
Freund's adjuvant	Difco Laboratories, Detroit, USA
4-Hydroxymercuribenzoessäure, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Natriumdesoxycholat	Sigma, St. Louis, USA
Pepstatin	Sigma, St. Louis, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	Serva, Heidelberg
Visking-Dialysierschläuche	Serva, Heidelberg

Alkohol-Oxidase aus *Candida boidinii* und Carboxypeptidase Y aus Hefe wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, Proteinase A aus Bäckerhefe von Sigma, St. Louis, USA bezogen. Proteinase B und die Proteinase Inhibitoren I^A_3 und I^B_2 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden freundlicherweise von Prof. H. Holzer (Universität Freiburg, i.Br.), Alkohol-Oxidase aus *Poria contigua* von Dr. S. Bringer (IBT 1, KFA Jülich) zur Verfügung gestellt.

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

a) Medien

Komplettmedium:

Hefe-Extrakt	4	g	
Malz-Extrakt	10	g	Der pH wurde mit 1 N NaOH
Glucose	4	g	auf 7.5 eingestellt.
Aqua dest.	1000	ml	
zur Verfestigung: Agar	20	g	

Minimalmedium:

NH_4NO_3	2	g	
$(NH_4)_2SO_4$	2	g	
KH_2PO_4	1	g	
K_2HPO_4	2	g	
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	1	g	Der pH wurde mit 1 N HCl
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0.20	g	auf 5.0 eingestellt.
KCl	0.20	g	
H_3BO_3	0.5	mg	
$CUSO_4 \times 5 H_2O$	0.04	mg	
KJ	0.10	mg	
$FeCl_3 \times 6 H_2O$	0.20	mg	
$MnSO_4 \times 1 H_2O$	0.40	mg	
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	0.40	mg	
$(NH_4)_4MO_7O_{24} \times 4 H_2O$	0.20	mg	
Biotin	0.05	mg	
Thiaminiumdichlorid	0.10	mg	
Aqua dest.	1000	ml	

Die Medien wurden 20 min bei 120° C autoklaviert. Die Kohlenstoffquellen wurden nach dem Autoklavieren in einer Konzentration von 10 g/l bzw. 10 ml/l steril zugegeben.

b) Kulturbedingungen

Sämtliche Kulturen wurden submers auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 30° C gezüchtet. Die Vorkulturen wurden in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 2 seitlichen Einstichen, die je 100 ml Komplettmedium enthielten, bei 100 U/min angezogen. Die Inkubationsdauer betrug 20 h. Die Hauptkulturen wurden in 2 l-Erlenmeyerkolben mit 2 seitlichen Einstichen, die je 400 ml Minimalmedium enthielten, bei 90 U/min angezogen.

Als Impfmateriel für die Hauptkultur dienten Zellen (ca. $2.2 \cdot 10^9$) einer zweimal mit steriler Saline (0.9 % NaCl) gewaschenen Vorkultur. (Einer OD_{600nm} von 0.2 entsprachen $7.6 \cdot 10^6$ Zellen/ml).

Bei Übertragungsexperimenten wurden 100 ml einer auf 1 % (v/v) Methanol gezüchteten Hauptkultur für die Rohextraktherstellung benutzt. Die restlichen Zellen der Hauptkultur wurden zweimal mit 0.1 M Natriumphosphat-Puffer pH 5.0 gewaschen und in gleichen Portionen auf 3 500 ml-Erlenmeyerkolben, die je 100 ml Minimalmedium oder 0.1 M Natriumphosphat-Puffer pH 5.0 mit 1 % (v/v) Äthanol oder 1 % (g/v) Glucose enthielten, übertragen und nach verschiedenen Inkubationszeiten geerntet. Dabei hatte Phosphat-Puffer gegenüber Minimalmedium den Vorteil, daß das Zellwachstum auf zelleigene Stickstoff-Reserven beschränkt und damit vermindert war.

Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Zeiss PM6 Spektralphotometer bestimmt.

Die Stammhaltung erfolgte bei 4° C auf Schrägagarröhrchen. Alle 6 - 8 Wochen wurde neu überimpft.

4. Elektronenmikroskopische Methoden

Zellen von *Candida boidinii* wurden 10 - 20 h in 3 % (g/v) Glutaraldehyd in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6.90 bei 4° C fixiert und anschließend 4 x mit demselben Puffer gewaschen. Die Nachfixierung, 30 min mit 2 % (g/w) KMnO_4 in Aqua dest. (Sahm et al., 1975), wie auch die nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Zellen in aufsteigender Äthanolreihe entwässert (15 min mit 20 %, 15 min mit 40 %, 30 min mit 60 %, 15 min mit 80 % und zweimal 15 min mit 100 % (v/v) Äthanol), zweimal 15 min mit Propylenoxid behandelt und anschließend nach der Methode von Spurr (1969) in folgendes Medium eingebettet:

ERL-4206	10	g
D.E.R. 736	6	g
NSA	26	g
DMAE	0.4	g

Die Zellen wurden 12 h in einem Gemisch aus 2 Teilen Propylenoxid und 1 Teil Einbettmedium und dann zweimal 12 h in reinem Einbettmedium inkubiert. Die Polymerisation erfolgte in Beem-Kapseln 11 h bei 70° C. Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser an einem LKB Ultratome III Ultramikrotome hergestellt. Die Schnitte wurden 5 - 7 min mit Bleicitrat (Reynolds, 1963) nachkontrastiert und in einem Siemens Elmiskop Ib Elektronenmikroskop untersucht.

5. Herstellung des Rohextraktes

Die Zellen wurden durch Zentrifugation 5 min bei 4000 x g geerntet und zweimal mit 0.1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7.5 gewaschen. Danach wurden die Zellen in demselben Puffer im Verhältnis 1 : 2 (g Feuchtgewicht/ml) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dreimal bei 1380 kg/cm^2 durch eine vorgekühlte French Presse (American Instruments Company, Maryland, USA) gedrückt. Wegen der relativ hohen Wärmeentwicklung in der 35 ml-French Presse beim Aufschluss größerer Zellmengen wurde dafür, insbesondere bei der Isolierung der Alkohol-Oxidase und der Anreicherung der Proteasen, eine X-Presse (AB Biox, Nacka, Schweden) verwendet. 25 ml Zellsuspension wurden in einer X-Presse bei -20°C eingefroren und mittels einer Hydraulik-Presse sechsmal durch eine Öffnung von 0.8 mm Durchmesser mit ca. 1000 kg/cm^2 gepreßt. Die Zellwände und Membranen werden dabei zusätzlich zu den mechanischen Kräften, die durch plötzliche Druckverminderung entstehen, durch Änderung der Kristallstruktur des Eises infolge des hohen Drucks zerstört.

Die Zelltrümmer und nicht aufgebrochenen Zellen wurden 20 min bei 30 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand diente als zellfreier Extrakt für weitere Untersuchungen.

Kochextrakt wurde aus Rohextrakt durch Kochen für 20 min hergestellt. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins 20 min bei 30 000 x g wurde der Kochextrakt im Rotationsverdampfer bei 45°C unter dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe eingengt.

6. Aktivierung der Proteasen im Rohextrakt

Da die Proteasen bei der Herstellung des Rohextraktes mit ihren Inhibitoren inaktive Komplexe bildeten, mußten sie zur Bestimmung ihrer Aktivitäten aus diesen Komplexen aktiviert werden. Folgende Aktivierungsbedingungen wurden gewählt:

a) Inkubation des Rohextraktes bei saurem pH

Der jeweilige pH-Wert wurde mit 1 N Essigsäure eingestellt. Das denaturierte Protein wurde 4 min bei 10 000 x g (Hettich, Mikroliter) abzentrifugiert.

b) Harnstoff-Aktivierung

Der Rohextrakt wurde mit einer 6 M Harnstoff-Lösung (in Aqua dest.) pH 6.0 im Verhältnis 1 : 1 gemischt und der pH mit 1 N Essigsäure auf den gewünschten Wert eingestellt. Denaturiertes Protein wurde 4 min bei 10 000 x g abzentrifugiert.

c) SDS-Aktivierung

Mit einer 10 %igen SDS-Lösung (in Aqua dest.) wurde der Rohextrakt auf 0.33, 0.67, 1.0 % SDS und mit einer 87 %igen Glycerin-Lösung auf 20 % Glycerin eingestellt.

Die Rohextrakte wurden zur Aktivierung bei Raumtemperatur inkubiert. (Falls länger als 10 h unter Zusatz von 0.02 % Natriumazid). Alle anderen Versuchsbedingungen sind im Ergebnisteil angegeben.

7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

a) Proteolytische Enzyme

Saure Protease

Die Aktivität der sauren Protease wurde gegenüber säure-denaturiertem Hämoglobin bei pH 3.0 nach der Methode von Hata et al. (1967 a), modifiziert von Saheki und Holzer (1974), bestimmt. Die aus dem Hämoglobin freigesetzten, TCA-löslichen Peptide und Aminosäuren wurden nach der von Mc Donald und Chen (1965) modifizierten Folin-Methode kolorimetrisch gemessen.

Herstellung des säuredenaturierten Hämoglobins:

1.2 g Hämoglobin wurden in 25 ml Aqua dest. suspendiert, mit 1 N HCl auf pH 1.0 eingestellt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Milchsäure (Endkonzentration: 0.1 M) wurde mit 1 N NaOH der pH-Wert auf 3.0 erhöht und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Der Reaktionsansatz enthielt 0.5 ml der säuredenaturierten Hämoglobin-Lösung und Rohextrakt und wurde mit Aqua dest. auf 0.6 ml aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 25° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml 10 % TCA gestoppt und das ausgefallene Protein 4 min bei 10 000 x g abzentrifugiert. 0.2 ml Überstand wurden mit 0.2 ml einer Lösung aus 10 ml 24 % NaCO₃, 1 ml 1 % CuSO₄, 1 ml 2,7 % Kaliumnatriumtartrat und 12 ml 1 N NaOH gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 ml Folin-Reagenz (1 : 20 mit Aqua dest. verdünnt) zugegeben, 30 min bei 37° C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 660 nm bestimmt. Als Kontrolle dienten Ansätze, die von Anfang an TCA enthielten.

Die Enzymeinheiten wurden als µg freigesetztes Tyrosin pro Minute angegeben (Hata et al., 1967 a).

Alkalische Protease

Hydrolytische Aktivität gegenüber Azocoll:

Azocoll ist ein unlösliches Protease-Substrat aus denaturiertem Kollagen der Kuhhaut, das mit einem Azofarbstoff komplexiert ist. Die Freisetzungsrates dieses Farbstoffs infolge der Spaltung von Peptidbindungen ist ein Maß für die proteolytische Aktivität. Der Azocoll-Test wurde nach der von Saheki und Holzer (1974) beschriebenen Methode durchgeführt:

0.5 ml 2.4 % (g/v) Azocoll in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7.0 wurden mit maximal 0.1 ml Rohextrakt 30 min bei Raumtemperatur unter kräftigem Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 0.5 ml 10 % TCA wurde die Reaktion gestoppt und nach Abzentrifugieren (4 min bei 10 000 x g) die Extinktion des Überstandes bei 520 nm bestimmt. Eine Enzymeinheit ist definiert als $\Delta E_{520nm}/min$ (Saheki und Holzer, 1975).

Hydrolytische Aktivität gegenüber Casein:

Die Enzymaktivität gegenüber Casein wurde mit Casein-Yellow, das als Chromophor Nitrotyrosin besitzt, bestimmt (Tsai et al., 1973). Die aus dem Casein freigesetzten Tyrosin-haltigen Peptide sind aufgrund ihrer Nitrogruppen im Alkalischen gelb gefärbt und können deshalb durch Extinktionsmessung bei 428 nm bestimmt werden.

Der Reaktionsansatz aus 0.5 ml 0.6 % (g/v) Casein-Yellow in 0.05 M Puffer und maximal 0.1 ml Rohextrakt wurde 60 min bei 25° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 0.1 ml 50 % TCA gestoppt. Nach Zentrifugation 4 min bei 10 000 x g wurde 0.6 ml Überstand mit 0.3 ml 10 N NaOH gemischt und die Extinktion bei 428 nm bestimmt.

Eine Enzymeinheit wurde definiert als $\Delta E_{428nm}/min$.

Carboxypeptidase

Die Enzymaktivität wurde mit N-Benzyl-L-Tyrosin-p-Nitroanilid als Substrat nach Aibara (1971) bestimmt. Die Extinktion des bei der Hydrolyse entstehenden p-Nitroanilids wurde spektrophotometrisch bei 405 nm in einem Zeiss PM 6 Spektralphotometer verfolgt. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 3 ml:

100 μ Mol Natriumphosphat-Puffer pH 7.0
0.6 μ Mol BTPNA (in 0.2 ml Dimethylformamid)
Rohextrakt

Der Nullwert wurde mit Dimethylformamid ohne BTPNA durchgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug 25⁰ C.

Eine Enzymeinheit wurde definiert als $\Delta E_{405nm}/min$ (Wolf, pers. Mitteilung).

Die spezifischen Enzymaktivitäten sind die Enzymeinheiten (U) pro Milligramm Protein des nicht aktivierten Rohextraktes.

b) Enzyme des dissimilatorischen Methanol-Stoffwechsels

Die Aktivitäten dieser Enzyme wurden spektrophotometrisch in einem Zeiss PM 6 Spektralphotometer bestimmt. Die Reaktionsansätze wurden bei 30⁰ C inkubiert.

Eine Enzymeinheit (U) entspricht der Enzymmenge, die 1 μ Mol Substrat pro Minute umsetzt. Enzymeinheiten pro Milligramm Protein sind definiert als spezifische Aktivität.

Alkohol-Oxidase

Die Alkohol-Oxidase Aktivität wurde über das bei der Oxidation entstehende H₂O₂ in einer gekoppelten Reaktion mit Peroxidase und dem Chromogen ABTS bestimmt (Sahm und Wagner, 1973 a). 2 Mole ABTS werden durch 1 Mol H₂O₂ oxidiert. Die Bildung des Radikalkations des ABTS wurde bei 420 nm ($\epsilon = 43.2 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol Methanol}$) verfolgt.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 3 ml:

100 μMol Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5,
gesättigt mit reinem O_2 .
100 μMol Methanol
3 μMol ABTS
7 Einheiten Peroxidase
Rohextrakt oder Enzym

Katalase

Die Enzymaktivität wurde über die Extinktionsabnahme bei 240 nm infolge der H_2O_2 -Spaltung bestimmt, wobei ein Extinktionskoeffizient von $0.04 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ zugrunde gelegt wurde (Bergmeyer, 1974). Der Reaktionsansatz von 3 ml enthielt:

100 μMol Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0
40 μMol H_2O_2
Rohextrakt

Formaldehyd-Dehydrogenase

Die Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase oxidiert Formaldehyd zu Formiat, wobei der entstehende Wasserstoff auf NAD übertragen wird (Schütte et al., 1976). Die Reduktion des NAD wurde bei 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$) nach der modifizierten Methode von Rose und Racker (1962) bestimmt. Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 3 ml:

100 μMol Natriumphosphat-Puffer pH 8.0
6 μMol reduziertes Glutathion
3 μMol NAD
2.9 μMol Formaldehyd
Rohextrakt

Formiat-Dehydrogenase

Die Enzymaktivität der NAD-abhängigen Formiat-Dehydrogenasen wurde nach der Methode von Schütte et al. (1976) über die Reduktion von NAD bei 340 nm bestimmt.

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml:

150 µMol Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5
5 µMol NAD
500 µMol Natriumformiat
Rohextrakt

8. Weitere Bestimmungsmethoden

a) Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach der Biuret-Methode (Gornall, 1949) bestimmt, wobei 0.2 ml Proteinlösung mit 1 ml Biuret-Reagenz gemischt und nach 30 min die Extinktion bei 580 nm gemessen wurde.

Biuret-Reagenz : 9 g Kaliumnatriumtartrat
 3 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
 5 g KJ
 1000 ml 0.2 N NaOH

Bei Proben mit einer Proteinkonzentration < 0.5 mg/ml wurde die Proteinbestimmung nach der von Bensadoun und Weinstein (1976) modifizierten Lowry-Methode durchgeführt:

1 ml Proteinlösung wurden mit 50 µl 0.3 % Natriumdesoxycholat 15 min inkubiert. Das Protein wurde anschließend mit 0.2 ml 36 % TCA gefällt und 4 min bei 10 000 x g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das ausgefällte Protein nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

Als Standard diente jeweils Rinderserumalbumin.

b) Formaldehydbestimmung

Formaldehyd wurde nach der von Nash (1953) beschriebenen Methode über die Bildung des gelben Farbkomplexes mit Acetylaceton und Ammoniumionen kolorimetrisch bestimmt.

Nash-Reagenz: 150 g Ammoniumacetat
3 ml Essigsäure, konzentriert
1000 ml Aqua dest.

1 ml Nash-Reagenz wurde zu 10 μ l Probe mit 10 - 100 nMol Formaldehyd gegeben und 10 min bei 60^o C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 412 nm gemessen. Für die Eichlösung wurde Formaldehyd aus Paraformaldehyd mit Aqua dest. durch Erhitzen in einer geschlossenen Flasche 12 h bei 105^o C hergestellt.

c) Bestimmung von Acetaldehyd

Acetaldehyd wurde gaschromatographisch mit einem Hewlett Packard Gaschromatograph, Modell 5840 A, mit Flammenionisationsdetektor bestimmt.

Chromatographiebedingungen:

Säule	: 2.5 m Glassäule mit 2 mm Innendurchmesser
Säulenfüllung	: Porapak Q
Trägergas	: N ₂
Trägergas-Durchflußgeschwindigkeit:	48 ml/min
Temperatur	: Einspritzblock 200 °C Ofen 80 °C Anfangstemperatur, nach 2.5 min. Temperaturgradient von 80 - 200 °C mit 20 °C/min Aufheizrate
	Detektor 200 °C
Probenvolumen	: 1 μ l

9. Isolierung der Alkohol-Oxidase

Aufgrund des hohen Molekulargewichts der Alkohol-Oxidase ist eine Isolierung über Saccharose-Gradientenzentrifugation möglich (Bringer et al., 1979). Die Alkohol-Oxidase wurde mittels dieser Methode direkt aus Rohextrakten oder nach Zentrifugieren der Rohextrakte 4 h bei 130 000 x g (Eggeling, 1976), was einen Reinigungsfaktor von 4 - 5 ergab, isoliert. Lineare Saccharose-Dichtegradienten (11 ml) von 7 - 24 % (g/v) Saccharose in 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5 wurden in SW 41 Cellulose-nitrat-Zentrifugenröhrchen hergestellt und mit 0.8 ml 7 % (g/v) Saccharose in obigem Puffer überschichtet. Darauf wurden die Proben von 0.5 ml (3 - 4 mg Protein) aufgebracht. Die Gradienten wurden in einem SW 41 Rotor 17 h bei 29 000 UpM und 4°C zentrifugiert. Zur Fraktionierung der Gradienten wurde 50 %ige (g/v) Saccharose von unten in die Zentrifugenröhrchen gepumpt.

10. Anreicherung der Proteasen

Da die alkalische Protease sehr instabil war, was auch von der alkalischen Protease aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hata et al., 1967 a) und aus *Neurospora crassa* (Siepen et al., 1975) berichtet wird, wurden alkalische und saure Protease als Enzym-Inhibitor-Komplexe angereichert. Der dazu benutzte Rohextrakt wurde in 0.05 M Natriumphosphat-Puffer pH 7.20 mit 1 mM Dithiothreitol hergestellt. Davon wurden 0.5 - 1.0 g Protein auf eine DEAE Cellulose DE 32 Säule (2.5 x 30 cm) aufgetragen, die zuvor mit 0.05 M Natriumphosphat-Puffer pH 7.20 und 1 mM Dithiothreitol äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit 600 ml dieser Pufferlösung wurde mit 400 ml 0.1 M NaCl in diesem Puffer und anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten (0.1 - 0.4 M NaCl, 800 ml Gesamtvolumen) eluiert. Das Protein im Eluat wurde mit einem LKB Uvicord III (0.1 ml Küvette mit 3 mm Lichtweg) bei

280 nm im Durchfluß gemessen und in 5 ml-Fraktionen gesammelt. Die Chromatographie wurde in einer kühlbaren Säule bei 4° C durchgeführt. Die Protease-Inhibitor-Komplex-haltigen Fraktionen wurden vereint und durch Ultrafiltration (PM 10-Membran, 2.5 atü N₂) konzentriert. Die Präparationen wurden in 0.5 ml-Portionen bei -20° C aufbewahrt und vor Gebrauch durch Inkubation bei pH 5.0 oder mit 0.67 % SDS und 20 % Glycerin aktiviert.

11. Analytische Disc-Elektrophorese

Die Gelelektrophoresen wurden in einer Apparatur für vertikale Plattengele von Bio-Rad, Modell 220, durchgeführt. Es wurde das von Jovin (1964) beschriebene anionische Trennsystem im Tris-Puffer verwendet:

Lösung A:	20	g Acrylamid	
	0.8	g Bisacrylamid	in 100 ml Aqua dest.
B:	30	g Acrylamid	
	0.8	g Bisacrylamid	in 100 ml Aqua dest.
C:	18,5	g TRIS	
	24	ml 1 N HCl	in 100 ml Aqua dest., pH 8.8
D:	0.14	g Ammonium-	
		persulfat	in 100 ml Aqua dest.
E:	5	g Acrylamid	
	1.25	g Bisacrylamid	in 100 ml Aqua dest.
F:	2.23	g TRIS	
	12.8	ml 1 M H ₃ PO ₄	in 100 ml Aqua dest., pH 6.7

Trenngele mit 5 bzw. 7.5 % (g/v) Polyacrylamid wurden durch Mischen der Lösungen A bzw. B, C und D im Verhältnis 1:1:2 hergestellt, die Sammelgele (1.25 % (g/v) Polyacrylamid) durch Mischen der Lösungen E, F und D im Verhältnis 2:1:1. Pro 10 ml Gemisch wurden jeweils 10 µl TEMED zugegeben.

Das Puffersystem bestand aus:

oberen Elektroden-Puffer (Kathode):

5.16	g	TRIS	
3.48	g	Glycin	pH 8.5
1000	ml	Aqua dest.	

unteren Elektroden-Puffer (Anode):

14.5	g	TRIS	
60	ml	1 M HCl	pH 8.0
1000	ml	Aqua dest.	

Es wurden pro Geltasche je 10 - 100 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine wurde in 1.5 mm breiten Plattengelen mit 10 mA im Sammelgel und 15 mA im Trenngel bei Wasserkühlung durchgeführt.

Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue R 250 nach Fairbanks (1971) gefärbt: 12 h in 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure mit 0.05 % Coomassie und anschließend 9 h in 10 % Isopropanol, 10 % Essigsäure mit 0.005 % Coomassie. Die Entfärbung der Gele erfolgte durch 10 % Essigsäure (ca. 2 - 3 Tage).

12. Analytische Elektrofokussierung

Für die Elektrofokussierung wurden LKB Ampholine PAGplates verwendet. Sie bestehen aus 5 % (g/v) Polyacrylamidgelen, die mit 2.4 % (g/v) Ampholine als Trägerampholyte in einer Schichtdicke von 1 mm auf dünne Plastikfolien polymerisiert sind. Es wurde der pH Bereich 3.5 - 9.5 verwendet.

Die Proben (2 - 3 µg Protein) wurden in der Mitte der Gele auf Filterpapierstückchen aufgebracht, die 30 min nach Beginn der Elektrofokussierung wieder entfernt wurden. Die Elektrofokussierung wurde in einem LKB 2117 Multiphor Gerät mit Wasserkühlung durchgeführt. Elektrolytflüssigkeiten waren 1 M H_3PO_4 (Anode) und 1 M NaOH (Kathode).

Elektrofokussierungsbedingungen:

Start : 180 V, 50 mA

Ende (ca. 2 h): 1350 V, 20 mA

Die Fixierung und Anfärbung der Proteine wurde nach der in der LKB Application Note 250 (1977) beschriebenen Methode durchgeführt: Die Proteine wurden 1 h in Lösung A fixiert. Zum Auswaschen der Ampholine wurden die Gele 30 min in Lösung C gelegt und anschließend 10 min bei 60° C in Lösung B gefärbt. Mit Lösung C wurden die Gele entfärbt.

Lösung A:	17.3	g Sulphosalicylsäure	
	57.5	g TCA	in 500 ml Aqua dest.
"	B:	0.46	g Coomassie Brilliant Blue R 250
			in 400 ml Lösung C
"	C:	500	ml Äthanol
		160	ml Essigsäure in 2000 ml Aqua dest.

13. Immunologische Methoden

a) Herstellung des Antiserums

Um ein monospezifisches Antiserum gegen Alkohol-Oxidase zu erhalten, wurden Kaninchen mit geleelektrophoretisch reiner Alkohol-Oxidase - isoliert nach der Methode von Sahm und Wagner (1973 a) von Herrn Schütte, GBF Braunschweig - immunisiert. An den Tagen 0, 21 und 42 wurden je 3 mg Alkohol-Oxidase, emulgiert in Freund's complete adjuvants, einem Kaninchen, dem zuvor Kontrollserum aus der Ohrvene entnommen wurde, subkutan in den Rücken injiziert. Am 56. Tag wurde Antigen ohne Adjuvants injiziert und 6 Tage danach Blut entnommen. Das Blut mußte einige Stunden bei Raumtemperatur gerinnen. Danach wurde das Serum dekantiert und 15 min bei 20 000 x g und 4° C abzentrifugiert, um sämtliche Blutzellen zu entfernen. Es wurde in 1 ml Portionen bei -20° C aufbewahrt.

b) Immundiffusion

Die Spezifität des so gewonnenen Antiserums wurde nach der Doppeldiffusionstechnik von Ouchterlony (1958) untersucht. In Petrischalen wurde eine etwa 5 mm dicke Agarschicht aus 1.5 % gereinigten Agar in 0.9 % NaCl mit 0.02 % Natriumazid gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden Löcher von 7 mm Durchmesser gestanzt, die mit 100 µl Antiserum (zentrales Loch) bzw. 100 µl der zu untersuchenden Proteinlösungen (äußere Löcher) beschickt wurden. Die Platten wurden in feuchter Atmosphäre bei Raumtemperatur inkubiert. Nach etwa 48 h waren scharfe Präzipitationsbanden zu erkennen. Wie Abb. 1 zeigt, bildete das Antiserum mit der Alkohol-Oxidase scharfe Präzipitationsbanden, während es mit Rohextrakten aus Glucose- und Äthanol-Zellen nicht reagierte. Das Kontrollserum (Kaninchenserum vor der Immunisierung) zeigte keine Präzipitation mit der Alkohol-Oxidase.

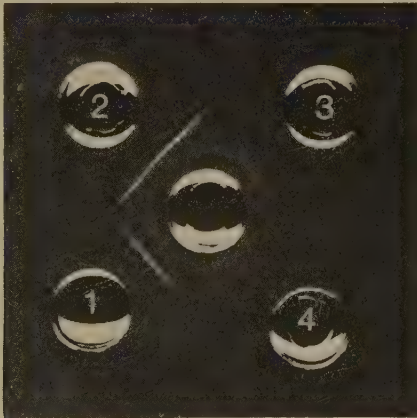


Abb. 1: Immundoppeldiffusionstest mit Rohextrakt aus Methanol-Zellen (1), isolierter Alkohol-Oxidase (2) und Rohextrakten aus Glucose- (3) und Äthanol-Zellen von *Candida boidinii* (4). Das zentrale Loch enthielt Antiserum gegen Alkohol-Oxidase aus *Candida boidinii*.

c) Immuntitration

Mit dieser Methode wurde untersucht, ob während des Abbaus der Alkohol-Oxidase inaktives Enzymprotein nachzuweisen ist, das noch mit dem Antiserum reagiert. Dazu wurden Rohextrakte von Glucose- oder Äthanol-inaktivierten Zellen auf gleiche Alkohol-Oxidase Aktivität (69 mU/ml) durch Verdünnung mit 0.1 M Phosphat-Puffer pH 7.5 eingestellt. Außer Rohextrakt wurde bei einigen Experimenten aus diesen Zellen isolierte Alkohol-Oxidase benutzt. Zu einer konstanten Menge Antiserum (25 μ l, 1 : 16 in obigen Puffer mit 0.05 M Glycerin verdünnt) wurden steigende Mengen (20 - 120 μ l) dieser so eingestellten Proben titriert. Jeder Reaktionsansatz enthielt ferner 125 μ l 0.1 M Phosphat-Puffer pH 7.5 mit 0.05 M Glycerin und wurde mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 300 μ l gebracht. Die Referenzansätze enthielten statt des Antiserums Puffer. Alle Ansätze wurden 1 h bei 30° C und anschließend 2 Tage bei 4° C inkubiert. Nach Abzentrifugieren des Immunpräzipitats 4 min bei 10 000 x g wurde die Alkohol-Oxidase Aktivität im Überstand bestimmt. Die Äquivalenzpunkte solcher Titrationen gaben Aufschluß über die Menge des immunologisch reaktiven Alkohol-Oxidase Proteins in Proben mit gleicher Alkohol-Oxidase Aktivität. Aus Abb. 2 geht hervor, daß der Äquivalenzpunkt proportional war zu der Menge Alkohol-Oxidase in der titrierten Probe.

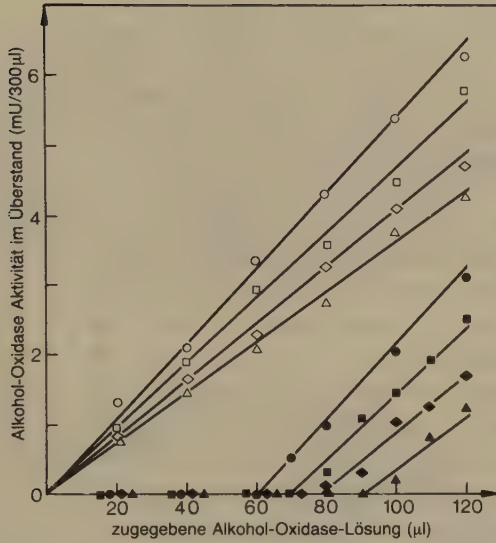


Abb. 2: Immuntitrationsen mit Lösungen verschiedener Alkohol-Oxidase Mengen. Zu einer konstanten Menge Antiserum wurden Lösungen mit folgender AOD-Konzentration (mU/ml) titriert: 41,6 (▲), 46,9 (◆), 54,4 (■) und 62,5 (●). Die Kontrollen enthielten kein Antiserum (offene Symbole).

III. ERGEBNISSE

1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Abbau der Peroxisomen

Um zu untersuchen, ob in *Candida boidinii* die Kohlenstoffquelle den Abbau der Peroxisomen in Methanol gewachsenen Zellen beeinflusst, wurden Zellen der späten exponentiellen Phase sowohl in ein Äthanol- als in ein Glucose-Medium übertragen. Gegenüber den ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Glutaraldehyd-OsO₄ fixierten Zellen (Bormann, 1977) wurde eine Glutaraldehyd-KMnO₄ Fixierung durchgeführt, da diese eine sehr gute Konstrastierung der Membranen ergab und somit für eine statistische Auswertung geeignet war. Die Zahl der auswertbaren OsO₄-postfixierten Zellen war dagegen äußerst gering. Für diese Fixierungsunterschiede wird die kompakte Zellwand der Hefe-Zellen (Kreger-van Rij und Veenhuis, 1971) verantwortlich gemacht, die ein Eindringen von OsO₄ in die Zelle weitgehend zu verhindern scheint (May, 1974; Osumi et al., 1975; Veenhuis et al., 1976).

Abb. 3A zeigt eine typische Methanol-Zelle von *Candida boidinii* mit einer Traube von 6 Peroxisomen (0.7 - 1.0 µm im Durchmesser), Zellkern, Vakuolen, Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum. Nach Übertragung in ein Äthanol-Medium nahm die durchschnittliche Anzahl der Peroxisomen auf 3 - 4 pro Zellschnitt nach 2 h und auf 2 nach 4 h ab (Abb. 4). Gleichzeitig verringerte sich die Größe der noch vorhandenen Peroxisomen auf 0.5 - 0.7 µm im Durchmesser (Abb. 3B). Diese Peroxisomen enthielten kristalloide Einschlüsse, die nur in OsO₄-postfixierten Zellen sichtbar waren (Bormann, 1977). Nach sechsstündiger Inkubation konnten in den meisten Zellen keine Peroxisomen mehr nach-

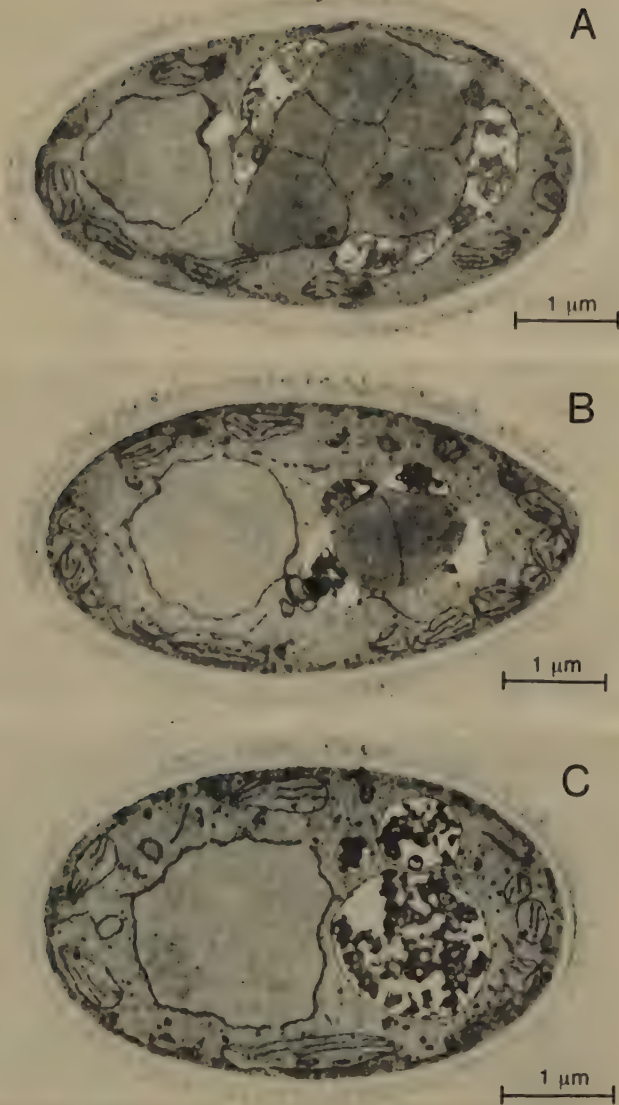


Abb. 3: Methanol-Zelle von *Candida boidinii* (geerntet am Ende der exponentiellen Phase; A) und nach Übertragung in Minimalmedium mit Äthanol nach 4 h (B) und 6 h (C).

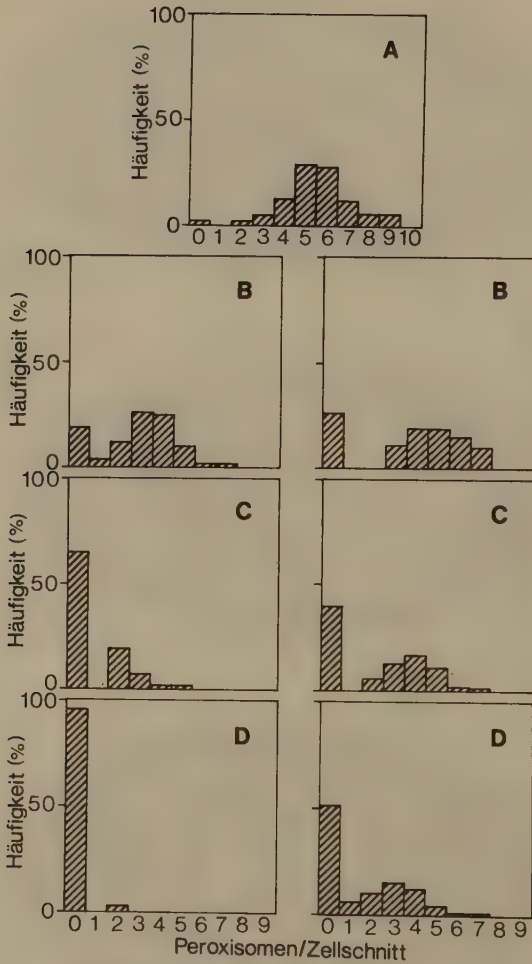


Abb. 4: Anzahl der Peroxisomen pro Zellschnitt in *Candida boidinii*. A: in Methanol-Zellen, am Ende der exponentiellen Phase geerntet, und nach Übertragen dieser Zellen in Minimalmedium mit Äthanol (linke Spalte) bzw. Glucose (rechte Spalte). B: 2 h, C: 4 h und D: 6 h nach Übertragen. Ausgezählt wurden jeweils 100 Zellen, die längs der Mitte geschnitten wurden.

gewiesen werden (Abb. 3C und 4D). Innerhalb dieser Zeit fand nur geringfügiges Zellwachstum statt.

Bei Übertragung von Methanol-Zellen in Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle begann das Zellwachstum sofort und die Zellen hatten sich innerhalb von 6 h verdoppelt. Demzufolge war eine Reduktion der durchschnittlichen Anzahl von Peroxisomen pro Zelle von 6 auf 3 zu erwarten. In etwa der Hälfte der untersuchten Zellen war dieses der Fall, während in den übrigen Zellen keine Peroxisomen mehr zu beobachten waren (Abb. 4D). Gleichzeitig nahm die Größe der Peroxisomen auf $0.2 - 0.5 \mu\text{m}$ im Durchmesser ab. Daraus folgt, daß auch bei Übertragung der Zellen in ein Glucose-Medium ein Abbau der Peroxisomen stattfindet. Im Gegensatz zu den in ein Äthanol-Medium übertragenen Zellen waren in diesen Zellen auch nach längerer Inkubation immer noch kleine Peroxisomen vorhanden (Abb. 5, Pfeil).

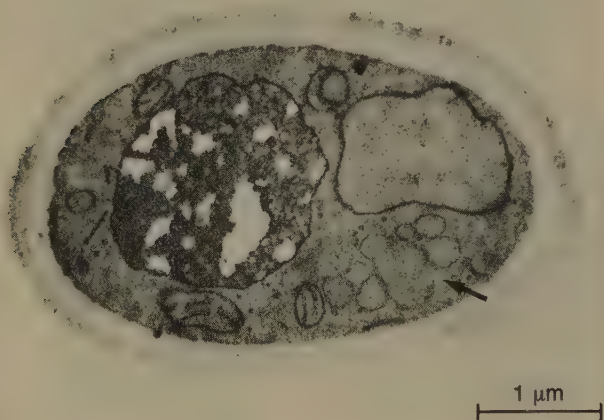


Abb. 5: Methanol gewachsene Zelle (48 h) von *Candida boidinii* nach 10 stündiger Inkubation in Minimalmedium mit Glucose.

Es ist unklar, ob diese kleinen, Glucose spezifischen Peroxisomen (Roggenkamp, 1976), erhalten gebliebene bzw. umgewandelte Methanol-Peroxisomen sind oder durch den Einfluß von Glucose neu gebildet wurden.

In den Äthanol- und Glucose-inaktivierten Zellen traten häufig vakuoläre Strukturen auf, die in Form und Lage zu noch intakten Organellen desintegrierten Peroxisomen glichen (Abb. 3B, 6). Die Vakuole in Abb. 7 könnte ein Übergangsstadium zwischen desintegriertem Peroxisom und Vakuole darstellen (Pfeil). Diese Beobachtung spricht für den Abbau ganzer Peroxisomen gegenüber einer stetigen Verkleinerung aller Peroxisomen, so wie es auch für die Peroxisomen der Rattenleber nachgewiesen wurde (Poole, 1969). In diesem Fall müßte zuerst ein Abbau der großen Peroxisomen stattfinden, da vornehmlich kleine Peroxisomen mit zunehmender Inkubationszeit festgestellt wurden.

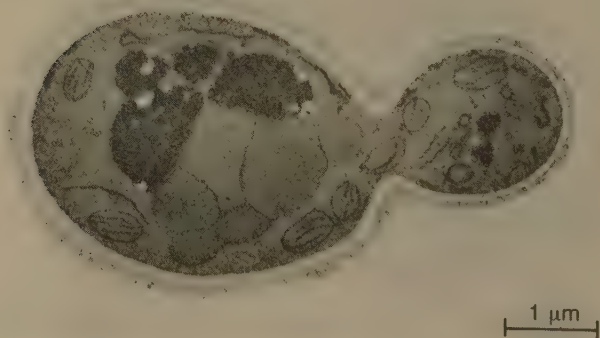


Abb. 6: Methanol-Zelle von *Candida boidinii* nach zweistündiger Inkubation in Minimalmedium mit Glucose.

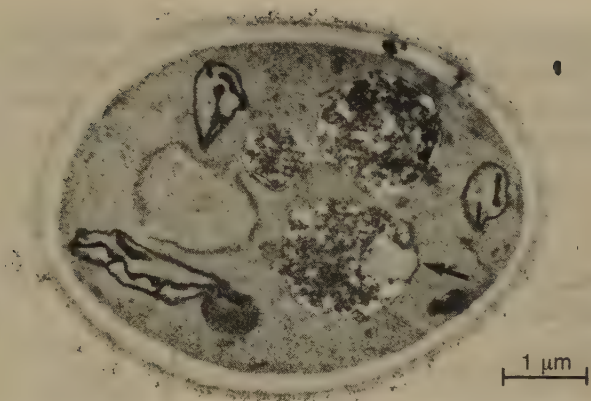


Abb. 7 und 8: Methanol-Zellen von *Candida boidinii* nach vierstündiger Inkubation in Minimalmedium mit Äthanol. Die Vakuole in Abb. 7 (oben, Pfeil) könnte ein Übergangsstadium zwischen Peroxisom und Vakuole darstellen. Abb. 8 (unten) zeigt den engen Kontakt der Peroxisomen zu Zellvakuolen.

Während des Abbaus der Peroxisomen wurde häufig ein enger Kontakt zu Zellvakuolen beobachtet (Abb. 8), von denen bekannt ist, daß sie in Hefe-Zellen die proteolytischen Enzyme bergen (Matile und Wiemken, 1967;

Cabib et al., 1973; Lenney et al., 1974; Hasilik et al., 1974). Jedoch eine Verbindung oder Fusion zwischen einer bereits bestehenden Vakuole und einem intakten Peroxisom konnte in keinem Fall beobachtet werden.

2. In vivo Versuche zur Inaktivierung der Alkohol-Oxidase und Katalase

a) Einfluß der Kohlenstoffquelle

Aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen ging hervor, daß bei Übertragung von Methanol-Zellen von *Candida boidinii* in ein Äthanol- oder Glucose-Medium ein Abbau der Peroxisomen stattfindet. Diese Befunde ließen eine parallel dazu verlaufende Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme Alkohol-Oxidase und Katalase erwarten, die im Fall mit Äthanol als C-Quelle bereits nachgewiesen wurde (Bormann, 1977). Die Ergebnisse für *Kloeckera* sp. (Yasuhara et al., 1976) deuteten auf einen Abbau der Peroxisomen ohne gleichzeitigen Abbau der darin lokalisierten Katalase bei Übertragung von Methanol-Zellen in ein Glucose-Medium hin.

Deswegen wurde parallel zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Einfluß der C-Quellen Äthanol (9A) und Glucose (9B) auf die spezifischen Aktivitäten von Alkohol-Oxidase und Katalase in Methanol-Zellen von *Candida boidinii* untersucht. Aus Abb. 9 geht hervor, daß auch in einem Glucose-Medium eine Inaktivierung von Alkohol-Oxidase und Katalase ausgelöst wurde, die aber etwas langsamer verlief als die Inaktivierung in einem Äthanol-Medium. Unter der Annahme, daß nach Übertragen der Methanol-Zellen die Synthese von Alkohol-Oxidase und Katalase reprimiert wird, erfolgt eine Abnahme der Enzymaktivitäten durch Herausverdünnen infolge des Zellwachstums (gestrichelte Linie in Abb. 9). Die Dif-

ferenz zwischen dieser berechenbaren und der gemessenen Aktivitätsabnahme zeigt, daß im Glucose-Medium die Inaktivierung annähernd nur halb so groß war wie im Äthanol-Medium.

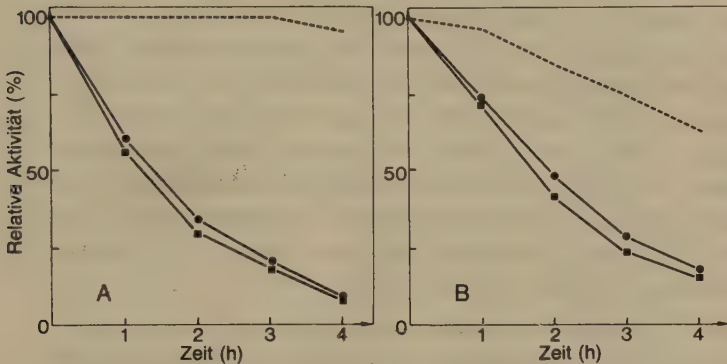


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Aktivitäten von Alkohol-Oxidase (●) und Katalase (■) nach Übertragung exponentieller Methanol-Zellen (42 h) in Phosphat-Puffer mit Äthanol (A) oder Glucose (B). Gestrichelt: Abnahme der Enzymaktivitäten bei Repression der Enzymsynthese infolge Zellwachstums. Die spezifischen Aktivitäten (U/mg) in exponentiellen Methanol-Zellen waren für AOD 0.68 und für Katalase 1365 und wurden als 100 % definiert.

Da bekannt ist, daß der Abbau einiger Enzyme in vivo durch Anwesenheit des Substrats verzögert werden kann, wie beispielsweise bei der Tryptophan-Oxygenase in der Leber durch Tryptophan (Pine, 1972), wurde untersucht, ob durch Zugabe von Methanol die Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme durch Glucose beeinflusst wird. Bei Übertragung von Methanol-Zellen in Phosphat-Puffer mit Glucose und 0.3 bzw. 0.6 % Methanol wurden jedoch die gleichen Inaktivierungskinetiken wie ohne Methanol erhalten (Abb. 9B). Somit ist ebenso wie für die Synthese der Alkohol-Oxidase - die katabolit-repri-

miert wird (Sahm und Wagner, 1973 b) - auch bei der Inaktivierung der Einfluß von Glucose gegenüber Methanol dominierend.

b) Einfluß der Wachstumsphase

Um Hinweise auf den Inaktivierungsmechanismus zu bekommen, wurde die Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme in Abhängigkeit von der Wachstumsphase untersucht. Denn es ist bekannt, daß in *Saccharomyces cerevisiae* die spezifischen Aktivitäten der proteolytischen Enzyme beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase um ein Mehrfaches zunehmen (Saheki und Holzer, 1975). Ähnliches gilt für mehrere Proteasen in Bakterien (Holzer et al., 1975).

Abb. 10 zeigt den Inaktivierungsverlauf von Alkohol-Oxidase und Katalase in exponentiellen, spät exponentiellen und stationären Methanol-Zellen während der Inkubation in einem Glucose-Medium. Zwischen exponentiellen und spät exponentiellen Zellen bestand kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Enzyminaktivierungen (unter Berücksichtigung des Aktivitätsverlusts durch Ausverdünnen infolge Wachstums). Dagegen war die Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme in stationären Methanol-Zellen deutlich höher.

c) Einfluß von Inhibitoren der Atmungskette

Die proteolytische Inaktivierung einiger Enzyme erfordert ATP, wie im Fall der Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase in *Hydrogenomonas facilis* und *Hydrogenomonas eutropha* (Kuehn und Mc Fadden, 1968), der Aspartat Transcarbamylase in *Bacillus subtilis* (Waindle und Switzer, 1973), der Isocitrat-Lyase in *Chlorella pyrenoidosa* (Thursten et al., 1973) und der NADP-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase in *Candida utilis* und *Saccharomyces cerevisiae* (Mazón, 1978; Hemmings, 1978). Auch ist der ge-

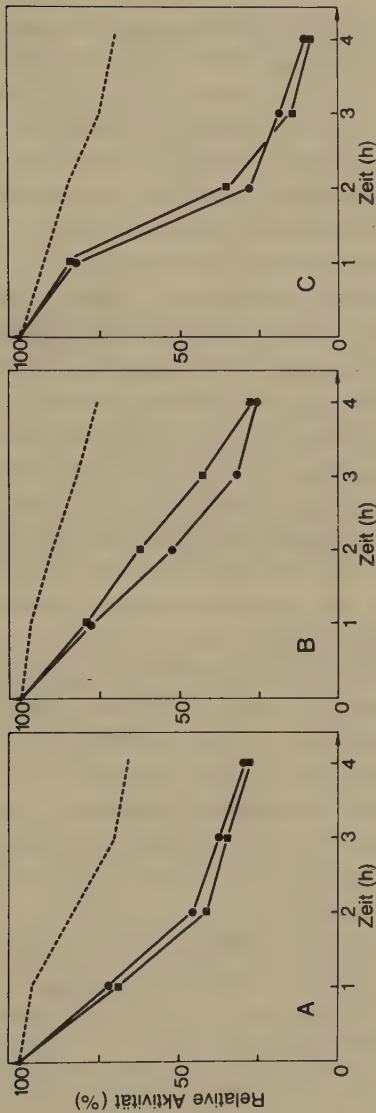


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Aktivitäten von Alkohol-Oxidase (●) und Katalase (■) nach Übertragung exponentieller (30 h; A), spät exponentieller (48 h; B) und stationärer (53 h; C) Methanol-Zellen in Phosphat-Puffer mit Glucose. Gestrichelt: Abnahme der Enzymaktivitäten infolge Wachstums. Die spezifischen Aktivitäten (U/mg) waren für AOD bzw. Katalase in A: 0.43, 731; in B: 1.10, 2237; in C: 1.30, 1588. Diese wurden als 100 % definiert.

nerelle Protein-Turnover in Mikroorganismen und höheren Organismen teilweise energieabhängig (Halvorson, 1958 a; Goldberg und Dice, 1974; Goldberg und John, 1976; Betz und Weiser, 1976; Ballard, 1977). Die Hydrolyse von Peptidbindungen ist jedoch eine exergone Reaktion und sollte keine Energie erfordern. Vermutlich wird die Energie für sekundäre, mit dem Proteinabbau verknüpfte Prozesse, wie z.B. Proteinsynthese, Transport von Proteinen durch Membranen oder Aufrechterhaltung eines Protonengradienten benötigt, da in vitro diese Energieabhängigkeit nicht mehr besteht (Ballard, 1977).

In *Candida boidinii* wurden zur Hemmung der ATP-Bildung Carbonylcyanid m-Chlorphenylhydrazon (CCCP), ein Entkoppler der Atmungskette (Heytler, 1963; Goldsby und Heytler, 1963), und Cyanid, ein Inhibitor der Cytochrom C-Oxidase (Slater, 1967), eingesetzt. Die wachstumshemmende Konzentration wurde für CCCP mit 10 μ M, für Cyanid mit 5 mM bestimmt. Bei dieser CCCP Konzentration wurde die Inaktivierung von Alkohol-Oxidase und Katalase in einem Glucose-Medium vollständig verhindert (Abb. 11). Die geringfügige Aktivitätsabnahme nach dreistündiger Inkubation trat auch in Kontrollexperimenten mit Inhibitor ohne C-Quelle auf. Cyanid verhinderte ebenfalls in der wachstumshemmenden Konzentration von 5 mM die Glucose induzierten Enzyminaktivierungen (Abb. 12). Demgegenüber wurde durch 1 mM Cyanid, wobei noch geringes Zellwachstum möglich war, die Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme verzögert.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß auch in *Candida boidinii* für die Inaktivierung der Enzyme Alkohol-Oxidase und Katalase Energie in Form von ATP notwendig ist.

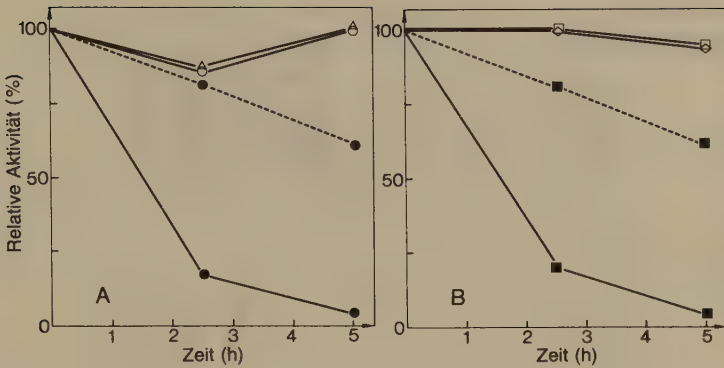


Abb. 11: Einfluß von CCCP auf die Inaktivierung der Alkohol-Oxidase (A) und Katalase (B) in vivo. Methanol-Zellen (43 h) wurden übertragen in Phosphat-Puffer mit Glucose (●, ■); mit Glucose und 10 μ M CCCP (○, □); mit 10 μ M CCCP (Δ, ◇). Gestrichelt: Abnahme der Enzymaktivitäten infolge Wachstums. 100 % entsprechen bei AOD 0.70 U/mg, bei Katalase 1224 U/mg.

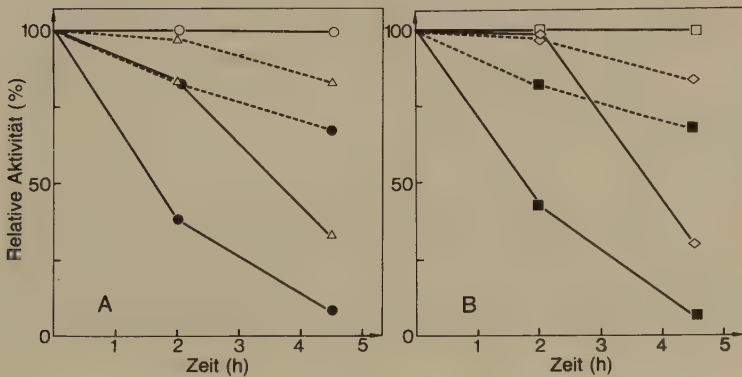


Abb. 12: Einfluß von NaCN auf die Inaktivierung der Alkohol-Oxidase (A) und Katalase (B) in vivo. Methanol-Zellen (43 h) wurden übertragen in Phosphat-Puffer mit Glucose (●, ■); mit Glucose und 1 mM NaCN (Δ, ◇); mit Glucose und 5 mM NaCN (○, □). Enzymaktivitäten wie in Abb. 11.

3. Untersuchung des Alkohol-Oxidase Proteins während der Inaktivierung

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde ausschließlich die katalytische Aktivität der Alkohol-Oxidase bestimmt. Der Verlust der Aktivität kann sowohl durch Modifikation als auch durch proteolytischen Abbau verursacht sein. Für ein Verständnis des Mechanismus und den direkten Nachweis von Proteinabbau ist es daher notwendig, das Enzymprotein zu untersuchen.

a) Quantitative Untersuchungen

Die Alkohol-Oxidase ist nach Polyacrylamid Gelelektrophorese von Rohextrakten als distinkte Bande anhand des R_f -Werts zu identifizieren (Roggenkamp, 1976). Somit konnte das Alkohol-Oxidase Protein während der Inaktivierung direkt verfolgt werden. Abb. 13 zeigt eine gelelektrophoretische Auftrennung von Rohextrakten spät exponentieller Methanol-Zellen und 2 h, 4 h und 6 h Äthanol-inaktivierter Zellen. In allen Fällen wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Es war eine Abnahme der Alkohol-Oxidase Bande (Pfeil) festzustellen, ein Beweis dafür, daß mit der Inaktivierung ein Abbau von Enzymprotein verbunden ist.

Auch für die Isocitrat-Lyase aus *Chlorella pyrenoidosa*, die 7 % des Gesamtproteins in Acetat-adaptierten Zellen darstellt und durch Glucose-Zugabe irreversibel inaktiviert wird, war mittels Gelelektrophorese der Nachweis eines proteolytischen Abbaus möglich (John et al., 1970).

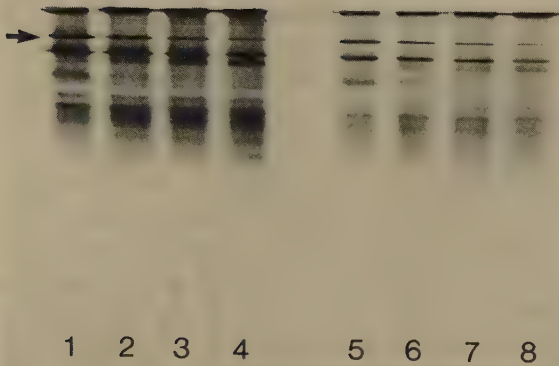


Abb. 13: Polyacrylamid Gelelektrophorese (7.5 % PA) von Rohextrakten Methanol gewachsener Zellen (1,4) und von Zellen, die 2 (2,5), 4 (3,6) und 6 (4,8) Stunden in einem Äthanol-Medium inkubiert worden waren. Aufgetrennt wurden jeweils 60 µg (1-4) und 30 µg Protein (5-8).

Da die densitometrische Auswertung der Gele zur quantitativen Bestimmung des Alkohol-Oxidase Proteins während der Inaktivierung zu große Ungenauigkeiten erbrachte, wurde die Alkohol-Oxidase aus Methanol-Zellen und Zellen unterschiedlicher Inaktivierungsstadien isoliert. Dafür bot sich die von Bringer et al. (1979) beschriebene Methode der Dichtegradientenzentrifugation an, da diese eine Isolierung direkt aus Rohextrakt in einem Schritt ermöglicht. Zwei typische Auftrennungen der Alkohol-Oxidase aus Rohextrakten von Methanol-Zellen und 1.5 h Äthanol-inaktivierten Zellen ist in Abb. 14 dargestellt. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen und die Proteinmenge und Enzymaktivität des Alkohol-Oxidase Peaks bestimmt. Die so isolierte Alkohol-Oxidase erwies sich als gelelektrophoretisch einheitlich (Abb. 15).

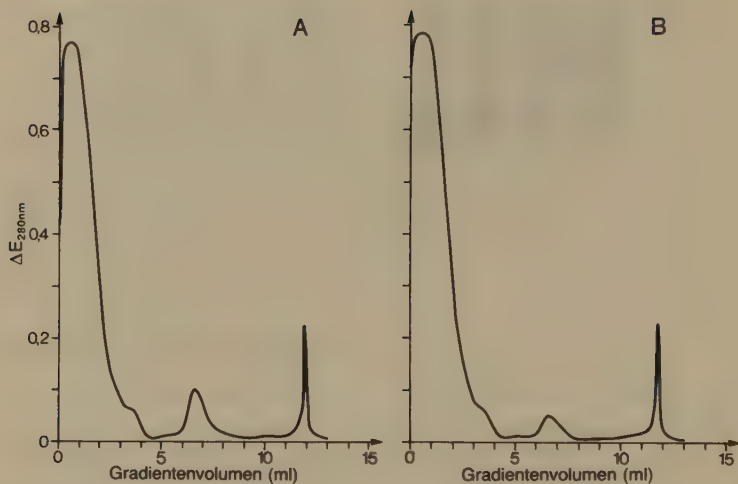


Abb. 14: Isolierung der Alkohol-Oxidase mittels Saccharose-Dichtegradienten Zentrifugation aus Rohextrakten von Methanol-Zellen (A) und 1.5 h Äthanol-inaktivierten Zellen (B). Aufgetragen wurden jeweils 4 mg Protein. Die AOD wurde zwischen 6 und 8 ml eluiert.

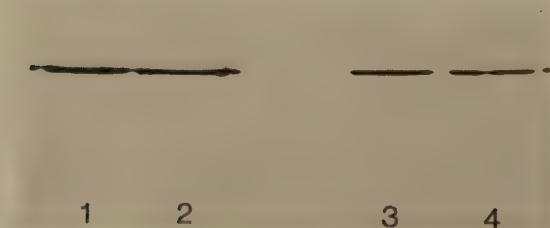


Abb. 15: Polyacrylamid Gelelektrophorese (5 % PA) der mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigten Alkohol-Oxidase aus Rohextrakten von Methanol-Zellen (1,3) und 1.5 h Äthanol-inaktivierten Zellen (2,4). Aufgetragen wurden 30 µg (1,2) und 20 µg Protein (3,4).

Die quantitative Auswertung ergab, daß der Abbau des Alkohol-Oxidase Proteins deutlich langsamer verlief als die Abnahme der spezifischen Alkohol-Oxidase Aktivität in vivo (Tab. 2). Zudem stellte sich heraus, daß die spezifische Aktivität der isolierten, gelelektrophoretisch reinen Alkohol-Oxidase nicht immer gleich groß, sondern niedriger war, je länger die jeweiligen Zellen im Äthanol-Medium inkubiert waren (Tab. 2). Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß während des Äthanol-induzierten Abbaus der Peroxisomen und der darin lokalisierten Enzyme inaktives Alkohol-Oxidase Protein gebildet wurde, das im Sedimentationsverhalten im Saccharose-Dichtegradienten und in den gelelektrophoretischen Eigenschaften, die durch Molekulargewicht, Form und Ladungszustand eines Proteins bestimmt werden, nicht von aktiver Alkohol-Oxidase zu unterscheiden war. Der Anteil des inaktiven Alkohol-Oxidase Proteins machte dabei die Differenz zwischen Abbau des Enzymproteins und den in vivo beobachteten Inaktivierungskinetiken aus (Tab. 2).

Weiterhin bestand in den ersten beiden Stunden nach Übertragung von Methanol-Zellen in ein Äthanol-Medium eine recht gute Korrelation zwischen dem Abbau des Alkohol-Oxidase Proteins und dem Abbau der Peroxisomen (Abb. 16), während bei längerer Inkubation die Abnahme der durchschnittlichen Anzahl Peroxisomen pro Zellschnitt höher zu sein schien. Diese Divergenz könnte dadurch zustande kommen, daß die Wahrscheinlichkeit, Peroxisomen in einem Zellschnitt zu erfassen, geringer wird je mehr Peroxisomen abgebaut sind.

Zeit nach Übertragung (h)	Alkohol-Oxidase im Rohextrakt (U/mg)	Aktivität (%)	Alkohol-Oxidase Aktivität gereinigt (U/mg)	Alkohol-Oxidase Protein (%)
0	1.25	100	13.79	100
0.75	0.84	67	10.75	78
1.5	0.48	38	7.94	58
2.0	0.37	30	6.67	48
3.0	0.20	16	4.54	33

Tab. 2: Abnahme der Alkohol-Oxidase in Methanol-Zellen (48 h) nach Übertragung in ein Äthanol-Medium. Es wurden die spezifische Aktivität im Rohextrakt, die spezifische Aktivität des isolierten Enzyms und die relative Menge des Enzymproteins bestimmt.

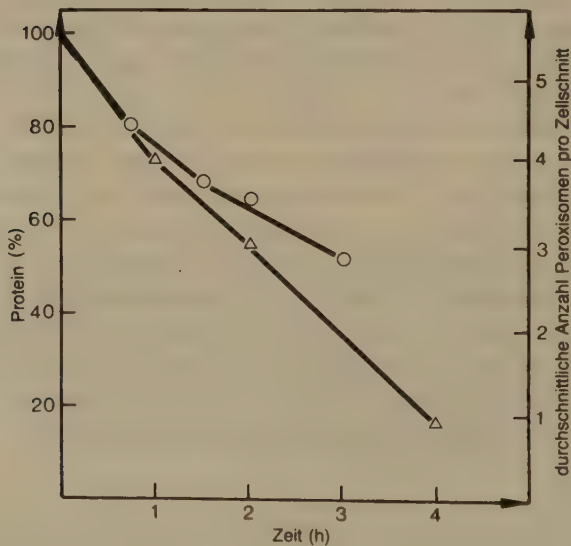


Abb. 16: Abnahme des Alkohol-Oxidase Proteins (O) und der durchschnittlichen Anzahl Peroxisomen pro Zellschnitt (Δ) während der Inkubation Methanol gewachsener Zellen (48h) in einem Äthanol-Medium.

b) Charakterisierung des inaktiven Alkohol-Oxidase Proteins in Äthanol-inaktivierten Zellen

Zur Charakterisierung des inaktiven Alkohol-Oxidase Proteins schien eine Trennung von aktivem und inaktivem Alkohol-Oxidase Protein erforderlich. Dazu bot sich die isoelektrische Fokussierung an, eine äußerst empfindliche Methode zur Auftrennung von Proteinen aufgrund des Nettoladungszustands unabhängig von Molekulargewicht und Form. Abb. 17 zeigt eine isoelektrische Fokussierung von Alkohol-Oxidase aus Methanol-Zellen und Äthanol-inaktivierten Zellen. Als Vergleich diente Alkohol-Oxidase aus dem Brautfäule Pilz *Poria contigua*. In jedem Fall wurde ein isoelektrischer Punkt von 5.35-5.55 bestimmt. Somit war aufgrund des Ladungszustands keine Unterscheidung zwischen aktiver und inaktiver Alkohol-Oxidase möglich.

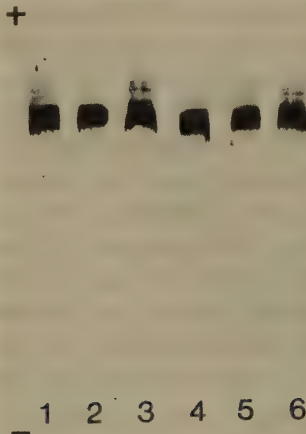


Abb. 17: Isoelektrische Fokussierung der Alkohol-Oxidase aus Methanol-Zellen (12.25 U/mg) (1, 4) und 1.5 h Äthanol-inaktivierten Zellen (7.94 U/mg) (2, 5) und der Alkohol-Oxidase aus *Poria contigua* (20 U/mg) (3, 6). Aufgetragen wurden 2 μ g (1-3) und 3 μ g Protein (4-6).

Weiterhin wurde untersucht, ob der Verlust der katalytischen Aktivität der Alkohol-Oxidase mit einer Veränderung der antigenen Eigenschaften verbunden war. Dazu wurden Immuntitrationsstadien mit Antikörpern, die gegen native Alkohol-Oxidase gerichtet waren, durchgeführt. Rohextrakte (Abb. 18) bzw. gereinigte Alkohol-Oxidase Präparationen (Abb. 19) wurden auf gleiche Alkohol-Oxidase Aktivität eingestellt, davon steigende Mengen zu einer konstanten Menge Antiserum titriert und die nicht präzipitierte Alkohol-Oxidase Aktivität bestimmt. Die unterschiedlichen Äquivalenzpunkte dieser Titrationsstadien zeigen, daß nicht nur die katalytisch aktive Alkohol-Oxidase mit den Antikörpern reagierte, sondern auch das inaktive Alkohol-Oxidase Protein. Dabei entsprach die Menge des inaktiven Proteins - innerhalb eines Fehlerbereichs von 10 % - der Menge inaktiver Alkohol-Oxidase, die sich aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der gereinigten Alkohol-Oxidase Präparationen ergab (vergl. Tab. 2). Demzufolge hat das während des Äthanol-induzierten Alkohol-Oxidase Abbaus entstehende inaktive Alkohol-Oxidase Protein die gleichen antigenen Eigenschaften wie das native Enzym, so daß eine drastische Konformationsänderung als Ursache für den Verlust an katalytischer Aktivität auszuschließen ist. Weiterhin läßt sich aus den Ergebnissen dieser Immuntitrationsstadien schließen, daß während des Abbaus der Alkohol-Oxidase Peptidfragmente mit der Fähigkeit, mit den Antikörpern gegen native Alkohol-Oxidase zu reagieren, nicht in größerer Menge auftreten.

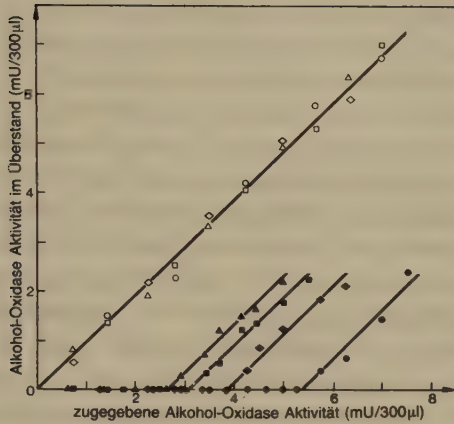


Abb. 18: Immuntitrationen der Alkohol-Oxidase aus Rohextrakten von Methanol-Zellen (●) und 0.75 h (◆), 1.5 h (■) und 2 h (▲) Äthanol-inaktivierten Zellen. Die Kontrollen enthielten kein Antiserum (offene Symbole).

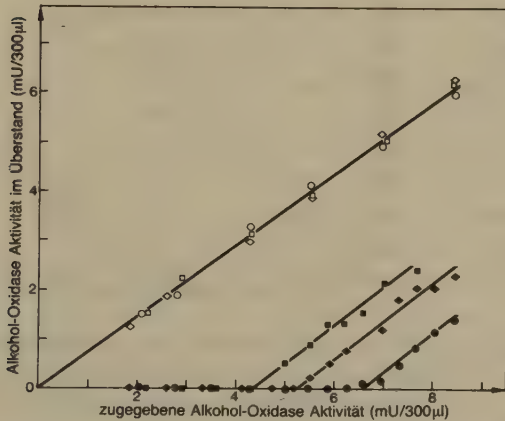


Abb. 19: Immuntitrationen der isolierten Alkohol-Oxidase aus Methanol-Zellen (13.79 U/mg; ●) und aus 0.75h (10.75 U/mg; ◆) und 1.5 h (7.94 U/mg; ■) Äthanol-inaktivierten Zellen. Die Kontrollen enthielten kein Antiserum (offene Symbole).

Gegenüber den Immuntitrationen der Alkohol-Oxidase aus Rohextrakten Äthanol-inaktivierter Zellen waren, wenn Rohextrakte von Glucose-inaktivierten Zellen eingesetzt wurden, die Äquivalenzpunkte untereinander identisch oder lagen innerhalb der Fehlergrenze (Abb. 20). Demzufolge entstand unter diesen Bedingungen kein inaktives Alkohol-Oxidase Protein und die in vivo beobachtete Aktivitätsabnahme war der Abnahme der Menge immunologisch reaktiven Proteins proportional. Dieses Resultat läßt vermuten, daß die Bildung des inaktiven Alkohol-Oxidase Proteins während der Inkubation von Methanol-Zellen in einem Äthanol-Medium nicht als Vorstufe und Voraussetzung für den selektiven proteolytischen Abbaus zu interpretieren ist, sondern vielmehr eine Äthanol-spezifische Ursache dafür zu suchen ist.

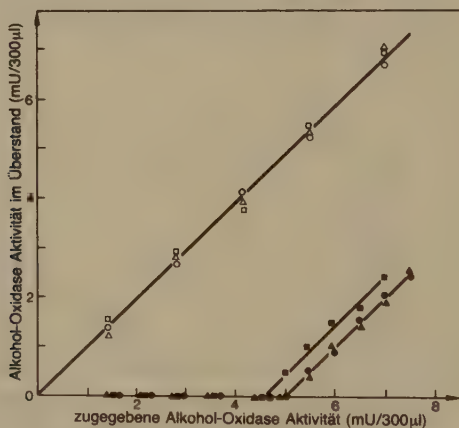


Abb. 20: Immuntitrationen der Alkohol-Oxidase aus Rohextrakten von Methanol-Zellen (●) und 2.5 h (■) und 5 h (▲) Glucose-inaktivierten Zellen. Die Kontrollen enthielten kein Antiserum (offene Symbole).

Während der Inkubation Methanol gewachsener Zellen von *Candida boidinii* in einem Äthanol-Medium war ein intensiver Geruch von Acetaldehyd festzustellen. Sahm und Wagner beschrieben (1973 a), daß die Alkohol-Oxidase Äthanol mit einer der Methanol-Oxidation vergleichbaren Reaktionsgeschwindigkeit zu Acetaldehyd umsetzt. Der K_m -Wert für Äthanol ist annähernd doppelt so groß wie für Methanol. Es ist bekannt, daß einige Enzyme durch Aldehyde infolge der Reaktion mit Sulfhydrylgruppen inhibiert werden können (Jacobi, 1963). Da für die katalytische Aktivität der Alkohol-Oxidase Cysteinreste essentiell sind (Sahm und Wagner, 1973 a), wäre eine Inaktivierung infolge einer Blockierung dieser Reste durch Acetaldehyd vorstellbar.

Deshalb wurde der Einfluß von Acetaldehyd auf die gereinigte Alkohol-Oxidase in vitro untersucht. Dazu war zunächst die Bestimmung des Verhältnisses von Acetaldehyd zur Alkohol-Oxidase Aktivität während der Inkubation von Methanol-Zellen in einem Äthanol-Medium notwendig. Die Menge des gebildeten Acetaldehyds in der Kulturbrühe wurde gaschromatographisch ermittelt und in Relation zu der Alkohol-Oxidase Aktivität pro Kolben gesetzt. In Tab. 3 sind diese Werte für exponentielle und stationäre Methanol-Zellen aufgeführt.

Zur Durchführung des Experiments wurde Acetaldehyd mit gereinigter Alkohol-Oxidase im Verhältnis 1.5 - 2.5 (mg/U) gemischt, 2 min bei 30° C inkubiert und anschließend die Alkohol-Oxidase Aktivität bestimmt. Es ergab sich ein 10 - 25 %iger Aktivitätsverlust. Demnach könnte das inaktive Alkohol-Oxidase Protein während des Äthanol-induzierten Abbaus, das bis 67 % des noch vorhandenen aktiven Enzyms ausmacht (siehe Tab. 2), durchaus auf den Einfluß von Acetaldehyd zurückzuführen sein. Die stärkere in vivo Inaktivierung der Alkohol-Oxidase könnte durch eine höhere lokale Konzentration des Acetaldehyds bedingt sein.

	Zeit nach Übertragung (h)	Acetaldehyd (mg/Kolben)	Alkohol- Oxidase (U/Kolben)	Acetaldehyd/ Alkohol-Oxidase (mg/U)
A	1	8.76	5.7	1.54
	2	5.01	2.7	1.86
	3	2.44	1.4	1.74
	4	1.49	0.7	2.13
B	1	33.31	22.0	1.51
	2	36.36	17.8	2.04
	3	24.89	10.2	2.44
	4	9.58	4.14	2.31

Tab. 3: Die Bildung von Acetaldehyd in Korrelation zur Alkohol-Oxidase Aktivität bei Übertragung exponentieller (A) und stationärer Methanol-Zellen (B) in ein Äthanol-Medium.

4. Untersuchungen zum proteolytischen System

Unter Ascomyceten und Basidiomyceten ist das proteolytische System in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besonders intensiv untersucht. Isoliert und charakterisiert wurden bisher die Endopeptidasen, Proteinase A und Proteinase B, die Carboxypeptidasen Y und S sowie drei Aminopeptidasen und die intrazellulären Inhibitoren der Proteinase A und B und der Carboxypeptidase Y (Wolf und Holzer, 1979). Da für die Hefe *Candida boidinii* bisher noch keine Untersuchungen über das proteolytische System vorliegen, wurden zunächst Experimente zur Bestimmung von Protease Aktivitäten im Rohextrakt in Anlehnung an die in *Saccharomyces cerevisiae* bekannten Verhältnisse gemacht.

In frisch hergestellten Rohextrakten von *Candida boidinii* waren gegenüber unspezifischen Protease-Substraten wie säuredenaturiertem Hämoglobin, Casein und Azocoll im

sauren, neutralen und alkalischen pH-Bereich keine oder nur Spuren proteolytischer Aktivität meßbar. Auch Alkohol-Oxidase und Katalase wurden durch Rohextrakt nicht inaktiviert. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß wie in Rohextrakten von *Saccharomyces cerevisiae* die Proteasen als inaktive Protease-Inhibitor-Komplexe vorlagen, die sich während des Zellaufschlusses infolge der Zerstörung intrazellulärer Kompartimente bildeten (Lenney und Dalbec, 1969; Hayashi und Hata 1972; Hayashi et al., 1972). Deshalb wurden Bedingungen für die Aktivierung der Proteasen im Rohextrakt von *Candida boidinii* ausgearbeitet.

a) Aktivierung der Proteasen im Rohextrakt

In *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Aktivierung der Proteasen durch Inkubation des Rohextrakts bei pH 5.0 und 25° C möglich (Lenney, 1956; Doi et al., 1967). Infolge des sauren pH-Werts wird Proteinase A durch Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes freigesetzt, wodurch eine autokatalytische Aktivierung der Proteasen durch 'Kreuz-Hydrolyse' ausgelöst wird: Proteinase B-Inhibitor wird durch Proteinase A abgebaut, Proteinase A-Inhibitor durch Proteinase B und Carboxypeptidase Y-Inhibitor durch die Proteinasen A und B (Saheki et al., 1974; Saheki und Holzer, 1975).

Während der Inkubation (bis 48h) von Rohextrakt von *Candida boidinii* bei pH 5.0 und Raumtemperatur waren proteolytische Aktivitäten gegenüber säuredenaturiertem Hämoglobin pH 3.0, Azocoll pH 7.0 und N-Benzoyl-L-Tyrosin-p-Nitroanilid pH 7.0 meßbar. Die Hemmbarkeit der Enzymaktivität gegenüber Hämoglobin durch Pepstatin ($5.83 \cdot 10^{-2}$ mM) und der beiden anderen durch Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM) ließen auf das Vorhandensein einer sauren Protease, einer alkalischen Serin-Protease und einer (oder mehrerer) Carboxypeptidase(n) schließen. (Aminopeptidasen wurden nicht untersucht.)

Da die Aktivierung bei pH 5.0 relativ langsam verlief (und im Fall der alkalischen Protease nicht reproduzierbar), wurden weitere Aktivierungsbedingungen getestet.

Für *Saccharomyces cerevisiae* ist beschrieben, daß verschiedene organische Agenzien, wie beispielsweise Dioxan, Harnstoff und Natriumdodecylsulfat, eine Aktivierung der Proteasen bewirken können (Hayashi et al., 1968; Jones, 1977).

Abb. 21A zeigt den Einfluß von 3M Harnstoff bei verschiedenen pH-Werten auf den Aktivitätsverlauf der sauren Protease im Rohextrakt von *Candida boidinii*. Keine bzw. eine minimale Aktivierung erfolgte bei pH 4.0 ± 3M Harnstoff. Als optimale Aktivierungsbedingungen erwiesen sich 20 - 24 stündige Inkubation des Rohextraktes mit 3M Harnstoff bei pH 6.0 und Raumtemperatur. Die alkalische Protease konnte mit 0.67 % SDS bei pH 7.0 und Raumtemperatur maximal aktiviert werden (Abb. 21 B). Die dafür benötigte Inkubationszeit war von der Wachstumsphase der Zellen abhängig. Sie betrug für stationäre Zellen 6 - 8 h, für exponentielle Zellen 24 - 30 h. Dagegen konnte durch Inkubation der Rohextrakte bei pH 5.0 nach 48 h nur ca. 40 % der durch SDS-Aktivierung möglichen Aktivität erreicht werden. Die alkalische Protease erwies sich als ein sehr instabiles Enzym. Innerhalb von 1.5 h nahm die maximale Aktivität um die Hälfte ab (Abb. 21B). Eine deutliche Stabilisierung konnte durch Zusatz von 20 % Glycerin erreicht werden. Auch für die Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hata et al., 1967 b) und die alkalische Protease aus *Neurospora crassa* (Siepen et al., 1975) wird eine hohe, vermutlich durch Selbstverdauung bedingte Instabilität beschrieben.

Als optimale Aktivierungsbedingungen für die Carboxypeptidase erwiesen sich zwei- bis fünfstündige Inkubation des Rohextraktes mit 0.67 % SDS und 20 % Glycerin bei pH 7.0 und Raumtemperatur (Abb. 21C).

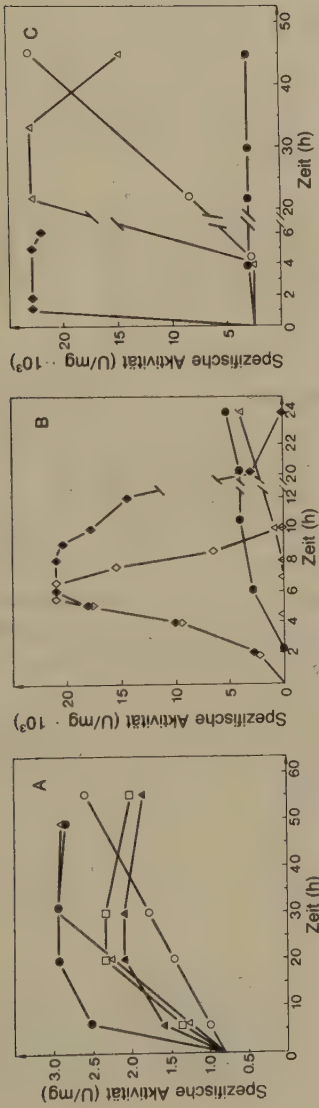


Abb. 21: Aktivierung der sauren Protease (A), alkalischen Protease (B) und Carboxypeptidase (C) im Rohextrakt stationärer Methanol-Zellen. Rohextrakt wurde inkubiert bei Raumtemperatur und pH 5.0 (△), pH 6.0 (○), pH 5.2 + 3M Harnstoff (▲), pH 6.0 + 3M Harnstoff (●), pH 6.7 + 3M Harnstoff (◻), pH 7.0 + 0.67 % SDS (◊), pH 7.0 + 0.67 % SDS + 20 % Glycerin (◆).

b) Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Aktivitäten der proteolytischen Enzyme

In Mikroorganismen scheint die Synthese der Proteasen durch Kohlenstoff- und Stickstoffquellen kontrolliert zu werden (Holzer et al., 1975). So werden in *Saccharomyces cerevisiae* während des Wachstums in einem Minimalmedium höhere Aktivitäten von Proteinase A und B und Carboxypeptidase Y gebildet als in einem Kompletmedium; außerdem steigen diese beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase um ein Mehrfaches an (Saheki und Holzer, 1975).

Der Verlauf der spezifischen Aktivitäten von saurer und alkalischer Protease und der Carboxypeptidase während des Wachstums von *Candida boidinii* in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen ist in Tab. 4 dargestellt. Sowohl auf Glucose als auch auf Äthanol und Methanol waren die Aktivitäten der drei proteolytischen Enzyme in der stationären Wachstumsphase jeweils signifikant höher als in der exponentiellen Phase. Die spezifische Aktivität der sauren Protease war in der exponentiellen Wachstumsphase auf Äthanol sowie auf Methanol etwa doppelt so hoch wie auf Glucose. Die Aktivitäten der alkalischen Protease und der Carboxypeptidase waren in der exponentiellen Phase in Methanol-Zellen etwa 4 - 5fach höher als in Glucose- und Äthanol-Zellen. Demnach scheint Glucose auch in *Candida boidinii* katabolit-reprimierend auf die drei proteolytischen Enzyme zu wirken, Äthanol auf die alkalische Protease und Carboxypeptidase.

Verglichen mit den spezifischen Aktivitäten der Proteinasen A und B des haploiden Wildtyps von *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm 2180B) in der stationären Wachstumsphase in Minimalmedium mit Glucose sind die entsprechenden Aktivitäten der sauren und alkalischen Pro-

Phlenstoff- quelle	Wachstums- phase	Kultur- dauer (h)	Zell- dichte (OD _{600nm})	Saure Protease Rohextrakt (U/mg)	nach Aktivierung (U/mg)	Alkalische Protease Aktivierung (U/mg · 10 ³)	nach Rohextrakt Aktivierung (U/mg · 10 ³)	Carboxypeptidase nach Rohextrakt Aktivierung (U/mg · 10 ³)
% (w/v) Glucose	exponentiell	10	3.7	0.32	0.78	0 - 3 (24)	0.7	3.0
	spät expo- nentiell	17	8.7	0.35	1.20	0 - 3 (24)	0.4	5.0
	10 h statio- när	34	14.0	0.77	2.97	14 - 22 (9)	0.5	14.0
% (v/v) ethanol	exponentiell	19	2.9	0.46	1.60	nicht meßbar	0.2	3.2
	spät expo- nentiell	38	10.5	0.57	2.10	0 - 4 (17)	0.3	4.5
	10 h statio- när	58	17.5	0.95	2.95	15 - 20 (7)	0.3	13.0
% (v/v) ethanol	exponentiell	34	2.5	0.65	1.40	0 - 3 (24)	1.0	12.0
	spät expo- nentiell	45	6.2	0.78	2.10	20 (7)	2.1	16.0
	10 h statio- när	65	8.0	0.84	2.92	20 - 25 (7)	2.5	25.0

Tab. 4: Aktivitäten von saurer und alkalischer Protease und Carboxypeptidase während des Wachstums von *Candida boidinii* in Minimalmedium mit Glucose, Äthanol oder Methanol als C-Quelle. Aktivierung der sauren Protease: 3M Harnstoff pH 6.0, 20 h; der alkalischen Protease: 0.67 % SDS + 20 % Glycerin pH 7.0, Inkubationszeit (h) in Klammern; der Carboxypeptidase: 0.67 % SDS + 20 % Glycerin pH 7.0, 1h.

tease in *Candida boidinii* annähernd um den Faktor 3 niedriger (Saheki und Holzer, 1975). In beiden Organismen ist die Aktivität der alkalischen Protease in nicht aktivierten Rohextrakten äußerst gering. Sie beträgt in *Saccharomyces cerevisiae* weniger als 2 % der nach Aktivierung durch Inkubation bei pH 5.0 vorhandenen Aktivität und ist in *Candida boidinii* gar nicht meßbar.

Weiterhin wurde der Verlauf der proteolytischen Enzymaktivitäten während der proteolytischen Inaktivierung von Alkohol-Oxidase und Katalase verfolgt. Dazu wurden Methanol gewachsene Zellen in ein Äthanol- oder Glucose-Medium übertragen, Rohextrakte zu verschiedenen Zeiten hergestellt und nach Aktivierung die Protease Aktivitäten bestimmt. Aus Tab. 5 geht hervor, daß im Gegensatz zu den peroxisomalen Enzymen keine bedeutsame Veränderung der Protease Aktivitäten stattfand. Die geringe Aktivitätsabnahme während der Inkubation in einem Glucose-Medium ist durch Repression der Synthese und ein Herausverdünnen der Enzyme infolge Zellvermehrung erklärbar.

Zeit nach Übertragung (h)	Zell- vermehrung	Saure Protease (U/mg)	Alkalische Protease (U/mg·10 ⁻³)	Carboxy- peptidase (U/mg·10 ⁻³)
0	1.0	2.30	22	16
Äthanol 2	1.0	2.36	22	16
Äthanol 4	1.0	2.28	22	16
Glucose 2	1.1	2.30	20	14
Glucose 4	1.3	1.80	15	11

Tab. 5: Aktivität von saurer und alkalischer Protease sowie der Carboxypeptidase in Methanol gewachsenen Zellen (48 h) und nach Übertragung in ein Äthanol- bzw. Glucose-Medium. Aktivierung der Enzyme im Rohextrakt: siehe Tab. 4.

Auch in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt eine Abnahme der proteolytischen Enzymaktivitäten infolge Repression der Enzymsynthese bei Glucose-Zugabe zu Acetat-dereprimierten Zellen (Hansen et al., 1977).

c) Anreicherung und Charakterisierung der proteolytischen Enzyme

Für eine nähere Charakterisierung und zur Untersuchung der Substratspezifität gegenüber Alkohol-Oxidase und Katalase als physiologischen Substraten war eine Anreicherung der sauren und alkalischen Protease aus *Candida boidinii* erforderlich. Wegen der hohen Instabilität der alkalischen Protease (Abb. 21B) wurden die Proteasen in Form der Enzym-Inhibitor-Komplexe fraktioniert und anschließend aktiviert.

Chromatographie von Rohextrakten an DEAE-Cellulose ergab unter den in 'Material und Methoden' beschriebenen Bedingungen 2 Peaks mit Protease-Aktivitäten: I) mit 0-0.1 M NaCl wurde der Enzym-Inhibitor-Komplex der alkalischen Protease eluiert, II) mit 0.18-0.28 M NaCl die Enzym-Inhibitor-Komplexe sowohl von saurer als auch alkalischer Protease (Abb. 22). Die letzteren Fraktionen enthielten außerdem 0.063 U/mg Carboxypeptidase. Die Fraktionierung der alkalischen Protease in 2 Peaks, davon einmal zusammen mit der sauren Protease, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß neben dem freien Enzym-Inhibitor-Komplex zusätzlich Komplexe vorliegen, an denen auch die saure Protease beteiligt ist. Solche Komplexe zwischen saurer und alkalischer Proteinase sind für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Hinze et al., 1975; Afting et al., 1976). Entgegen den Verhältnissen in Rohextrakten erwies sich für eine Aktivierung der sauren und alkalischen Proteinase in den Fraktionen II eine drei- bis zehnstündige Inkubation bei pH 5.0

als am günstigsten. Dadurch wurde eine insgesamt 13-fache Anreicherung erreicht (Tab. 6). Demgegenüber war eine Aktivierung der alkalischen Protease in der Fraktion I durch Inkubation bei pH 5.0 nicht möglich. Dies ist ein Hinweis darauf, daß ähnlich wie bei *Saccharomyces cerevisiae* diese Aktivierung auf einem 'kreuzweise' proteolytischen Abbau der Protease-Inhibitoren beruht und somit das Vorhandensein sowohl von saurer als auch alkalischer Protease erfordert (Saheki et al., 1974).

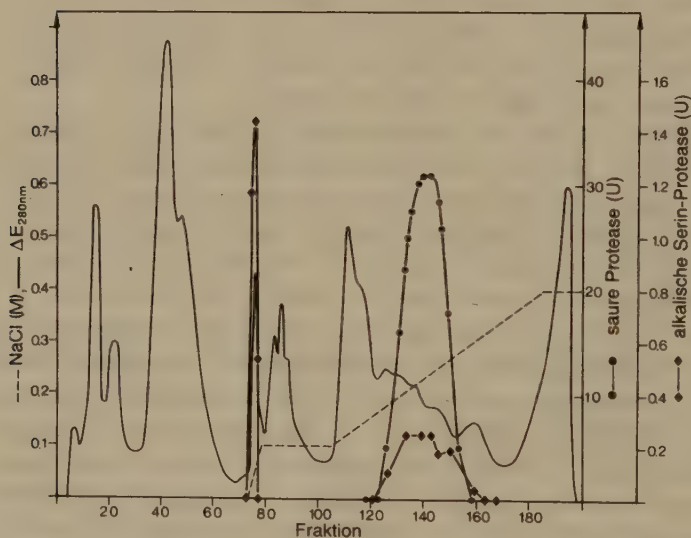


Abb. 22: Chromatographie der Enzym-Inhibitor-Komplexe von saurer (●) und alkalischer Protease (◆) an DEAE-Cellulose (2.5 x 30 cm). Elution mit 0.1 M NaCl und einem linearen Gradienten von 0.1-0.4 M NaCl in 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.2 und 1 mM Dithiothreitol. Fließrate: 50 ml/h; Fraktionsgröße: 10 ml; Protein: Absorption bei 280 nm.

Anreicherungs- schnitt	Volumen (ml)	Protein (mg)	S a u r e P r o t e a s e				A l k a l i s c h e P r o t e a s e			
			Gesamt- aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Anreiche- rung -fach	Ausbeute (%)	Gesamt- aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Anreiche- rung -fach	Ausbeute (%)
Zellfeier 1) Rohextrakt	37	586.0	1494	2.55	1.0	100	12.89	0.022	1.0	100
DEAE-Cellulose- Chromatogra- phie, konzen- trierte Frak- tionen:										
I) : 75-77 ²⁾	3.2	48.0	10	0.21	-	0.7	4.26	0.088	4.0	33
II) : 130-150 nicht aktiviert	4.0	41.1	274	6.68	2.6	18	nicht meßbar			
nach Aktivierung -10h pH 5.0	4.0	13.7	450	32.80	12.9	30	4.00	0.292	13.3	31

Tab. 6: Anreicherung der sauren und alkalischen Protease aus *Candida boidinii*.
¹⁾ nach Aktivierung wie in Tab. 4 beschrieben; ²⁾ nach SDS-Aktivierung

Mit diesen so angereicherten Enzymfraktionen wurde zunächst der Einfluß des pH-Werts auf die Aktivität von saurer und alkalischer Protease untersucht. Abb. 23 zeigt die pH-Aktivitätskurve der sauren Protease (Frakt. II) mit säuredenaturiertem Hämoglobin als Substrat, wobei die Restaktivitäten der alkalischen Protease und Carboxypeptidase durch 2 mM PMSF inhibiert waren. Das pH-Optimum lag bei pH 3.5. Für die Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* wird von Hata et al. (1967 a) für die Hydrolyse von HCl-Hämoglobin ein pH-Optimum von 3.0 und von Lenney (1975) eines von 3.5 beschrieben.

Die Aktivität der alkalischen Protease (Frakt. I) in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde mit Azocoll und Casein-Yellow als Substraten untersucht (Abb. 24). Azocoll wurde in einem pH-Bereich von 7.0 - 9.5 optimal hydrolysiert, Casein-Yellow bei 9.0 - 10.0. Für Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae* ist für die Azocoll-Hydrolyse ein pH-Optimum von 6.2 - 8.0 (Ulane und Cabib, 1976), für die Casein-Hydrolyse ebenfalls eines von 9 - 10 beschrieben (Hata et al., 1967 b).

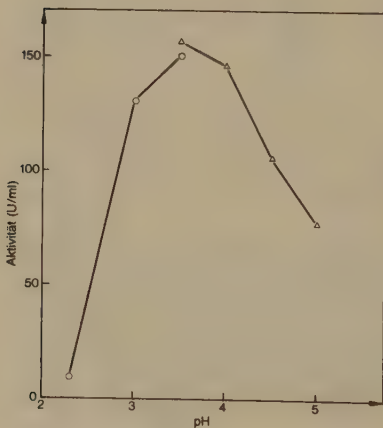


Abb. 23:

Aktivität der angereicherten sauren Protease gegenüber säuredenaturiertem Hämoglobin in Abhängigkeit vom pH-Wert: in 0.1 M Lactat-Puffer (o), 0.1 M Na-Acetat-Puffer (Δ).

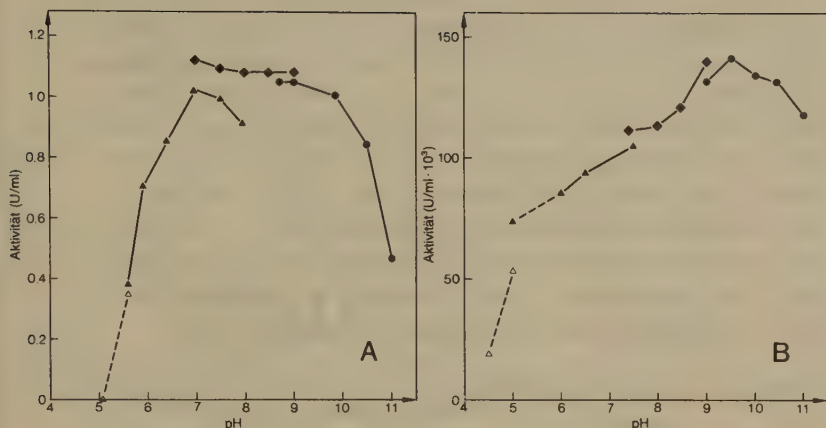


Abb. 24: Aktivität der angereicherten alkalischen Protease gegenüber Azocoll (A) und Casein-Yellow (B) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Aktivität wurde in 0.1 M (A) bzw. 0.05 M (B) Puffern bestimmt: Na-Acetat (Δ), Na-Phosphat (▲), TRIS/HCl (◆), Glycin/NaOH (●). Gestrichelt: Aktivität nicht proportional zur Enzymmenge.

Zur Charakterisierung des aktiven Zentrums der proteolytischen Enzyme aus *Candida boidinii* wurden Hemmversuche mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Neben Pepstatin, einem von Actinomyceten produziertem Peptid, das an die Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure bindet (Tang, 1976), und PMSF, einem Serin-Reagenz (Gold, 1967), wurden die Sufhydryl-Reagenzien PCMB (Boyer, 1954) und $HgCl_2$ (Webb, 1966), sowie das spezifisch auf Metallo-Enzyme durch Chelatbildung wirkende EDTA getestet (Tab. 7). Die vollständige Inhibition der sauren Protease durch Pepstatin zeigt, daß Asparagin- oder Glutaminsäure-Reste für die Aktivität essentiell waren. Die Sensibilität der alkalischen Protease und der Carboxypeptidase gegenüber PMSF, PCMB und $HgCl_2$ deutet auf die Notwendigkeit von Serin- und Sulfhydryl-Resten für die katalytische Aktivität hin.

Metallionen scheinen für die Aktivität von saurer und alkalischer Protease nicht essentiell zu sein, da die Enzyme nicht durch EDTA inhibiert wurden. Die 8 %ige Inhibition der Carboxypeptidase durch EDTA könnte darauf hinweisen, daß im BTPNA-Test eventuell mehr als ein Enzym mit Carboxypeptidase-Aktivität erfaßt werden und davon eines Metallionen-abhängig ist. Hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber diesen spezifischen Inhibitoren gleichen die proteolytischen Enzyme aus *Candida boidinii* den Proteinasen A und B und der Carboxypeptidase Y aus *Saccharomyces cerevisiae* (Wolf und Holzer, 1979).

Inhibitor	Konzentration (mM)	Verbleibende Aktivität (%)		
		Saure Protease	Alkalische Protease	Carboxy- peptidase
Kein	-	100	100	100
Pepstatin	$5.83 \cdot 10^{-2}$	1	100	100
PMSF	1	97	10	0
	2	97	2	-
HgCl ₂	1	96	3	0
PCMB	0.5	100	0	0
EDTA	5	100	98	92

Tab. 7: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf saure Protease (30 U/mg), alkalische Protease (0.28 U/mg) und Carboxypeptidase (0.02 U/mg). Die Aktivitäten wurden nach 10 min. Inkubation mit den Inhibitoren bestimmt.

Um zu untersuchen, ob die intrazellulären Inhibitoren der sauren und alkalischen Protease wie in *Saccharomyces cerevisiae* (Holzer, 1975) hitzestabile Proteine sind, wurden Inhibitionsexperimente mit Kochextrakten von *Candida boidinii* durchgeführt. Die 65 - 75 % bzw. 100 %ige Inhibition der sauren bzw. alkalischen Protease-Aktivität durch steigende Mengen Kochextrakt beweist das Vorhandensein hitzestabiler Inhibitoren in *Candida boidinii*. Die unvollständige Hemmung der sauren Protease

könnte darin begründet liegen, daß keine gereinigten Protease- und Inhibitor-Präparationen verwendet wurden (Abb. 25).

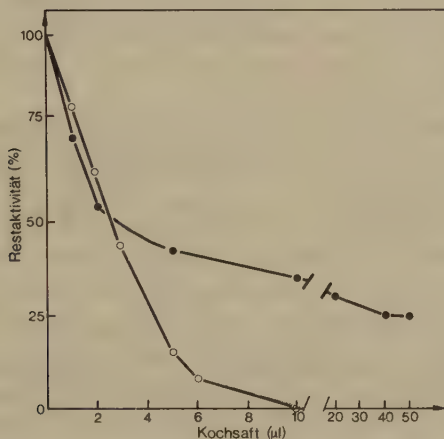


Abb. 25: Hemmung der sauren (●) und alkalischen Protease (○) durch Kochextrakt bei pH 6.0. 100 % entsprechen 2.4 U/Ansatz saure Protease, 14 mU/Ansatz alkalische Protease. Der eingeeingte Kochextrakt enthielt 32.32 mg/ml Protein. Volumen der Testansätze: 0.2 ml.

Wegen der zahlreichen gemeinsamen Eigenschaften der sauren und alkalischen Protease aus *Candida boidinii* und der Proteinasen A und B aus *Saccharomyces cerevisiae* erschien es interessant zu untersuchen, ob eine Reaktion zwischen den proteolytischen Enzymen aus *Candida boidinii* und den Proteinase-Inhibitoren aus *Saccharomyces cerevisiae* möglich war. Zur Verfügung standen dafür die Inhibitoren I^A_3 und I^B_2 , hitzestabile Proteine, die spezifisch Proteinase A bzw. B aus *Saccharomyces cerevisiae* hemmen (Saheki et al., 1974; Betz et al., 1974). Aus Tab. 8 geht hervor, daß I^A_3 eine Hemmwirkung auf die saure Protease aus *Candida boidinii* hatte. Die alkalische Protease aus *Candida boidinii* wurde nahezu vollständig durch I^B_2 in-

hibiert (Abb. 26). Allerdings war für eine 50 %ige Inhibition annähernd die doppelte Menge I^B_2 erforderlichlich wie für die gereinigte Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dies könnte eine geringere Affinität des I^B_2 -Inhibitors zu der alkalischen Protease aus *Candida boidinii* bedeuten oder dadurch bedingt sein, daß mit einer angereicherten Protease-Fraktion gearbeitet wurde.

Inhibitor I^A_3 (μ l/Ansatz)	Saure Protease (U/Ansatz)	Inhibition (%)
0	2.36	0
100	1.36	42
150	1.00	57

Tab. 8: Einfluß des Inhibitors I^A_3 aus *Saccharomyces cerevisiae* auf die Aktivität der sauren Protease aus *Candida boidinii* bei pH 7.0. Volumen der Testansätze: 0.45 ml.

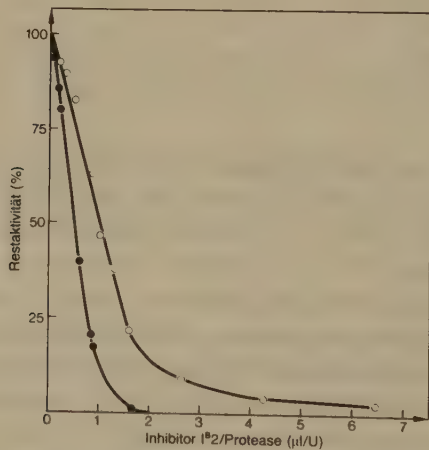


Abb. 26: Einfluß des Inhibitors I^B_2 aus *Saccharomyces cerevisiae* auf die alkalische Protease aus *Candida boidinii* (o) und Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae* (●) bei pH 7.0.

Diese Experimente zeigen, daß auch hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch die untersuchten, intrazellulären Protease-Inhibitoren die saure und alkalische Protease aus *Candida boidinii* den Proteinasen A und B aus *Saccharomyces cerevisiae* sehr ähnlich sind.

5. In vitro Versuche zur proteolytischen Inaktivierung von Alkohol-Oxidase und Katalase

Untersuchungen zur Substratspezifität der Proteinasen A und B und der Carboxypeptidase Y aus *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber Hefe-Enzymen als physiologischen Substraten ergaben ein recht unterschiedliches Wirkungsspektrum (Jušić et al., 1976). Dabei zeigte sich, daß die katabolit-inaktivierbare cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase äußerst sensitiv gegenüber den Proteinasen A und B, die Fructose-1,6-bisphosphatase gegenüber Proteinase B war. Eine spezifische Aktivierung eines der drei proteolytischen Enzyme als Folge veränderter physiologischer Bedingungen könnte demnach Teil der Kontrolle eines intrazellulären proteolytischen Prozesses sein.

In vitro Versuche mit angereicherten Proteasen aus *Candida boidinii* sollten Aufschluß über die Spezifität gegenüber den peroxisomalen Enzymen Alkohol-Oxidase und Katalase geben. Wegen der großen Ähnlichkeit wurden die gereinigten Proteinase A und B aus *Saccharomyces cerevisiae* in solchen Experimenten eingesetzt, in denen höhere Protease-Aktivitäten benötigt wurden.

a) Einfluß der Proteasen auf gereinigte Alkohol-Oxidase

Für die in vitro Tests wurden die Enzymaktivitäten in den gleichen Verhältnissen eingesetzt, wie sie in Rohextrakten gefunden wurden. Ausgehend von einem durchschnittlichen Proteingehalt von 10 mg/ml sind in 1 ml Rohextrakt

von stationären Methanol-Zellen 30 U saure Protease, 0.25 U alkalische Protease, 0.25 U Carboxypeptidase (Tab. 4) und 12 U Alkohol-Oxidase enthalten. Unter diesen Verhältnissen hatten die angereicherte saure Protease und die Carboxypeptidase keinen Einfluß auf die Aktivität der Alkohol-Oxidase während Inkubation bei 30 °C und pH 6.8 und 7.5. Im Fall der sauren Protease könnte dieses Ergebnis in der niedrigeren Aktivität bei höheren pH-Werten begründet liegen. Die Aktivität betrug mit Casein-Yellow als Substrat bei pH 6.8 noch 7%, bei pH 7.5 noch 4.5% der Aktivität gegenüber Hämoglobin bei pH 3.0. (Da Hämoglobin und Casein-Yellow ober- bzw. unterhalb pH 5.0 ausfallen, mußten für die Aktivitätsbestimmung im pH-Bereich 3.0 - 7.5 beide Substrate verwendet werden.) Deswegen wurden in vitro Tests mit der 15- bzw. 25fachen Menge an Proteinase A bzw. Carboxypeptidase Y aus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Auch unter diesen Verhältnissen trat innerhalb von 2h bei 30 °C und pH 6.8 und 7.5 kein Aktivitätsverlust der Alkohol-Oxidase auf. Demgegenüber wurde die Alkohol-Oxidase durch die alkalische Protease aus *Candida boidinii* innerhalb von 22 min und durch Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae* innerhalb von 11 min bei 30 °C und pH 7.5 um 50% inaktiviert (Abb. 27). Die Inaktivierung zeigte Kinetiken einer Reaktion 1. Ordnung hinsichtlich der Alkohol-Oxidase Aktivität (Abb. 28a). Dabei stellte die Geschwindigkeitskonstante $k = \frac{\ln c_0 - \ln c_t}{t}$ ein Maß für die Aktivität der alkalischen Protease dar (Abb. 28b), wobei c_0 die Anfangsaktivität der Alkohol-Oxidase und c_t die Aktivität zur Zeit t ist.

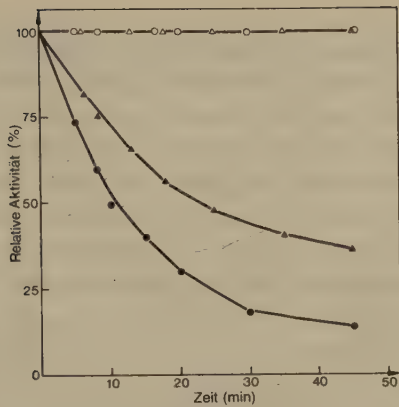


Abb. 27: Einfluß von alkalischer Protease aus *Candida boidinii* (▲) und Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae* (●) auf die Aktivität der Alkohol-Oxidase bei pH 7.5. Die Ansätze enthielten in 100 µl 1.2 U AOD und 25 mU Protease. Die Kontrollen enthielten IB₂ (offene Symbole). Die Inkubations-temperatur betrug 30 °C.

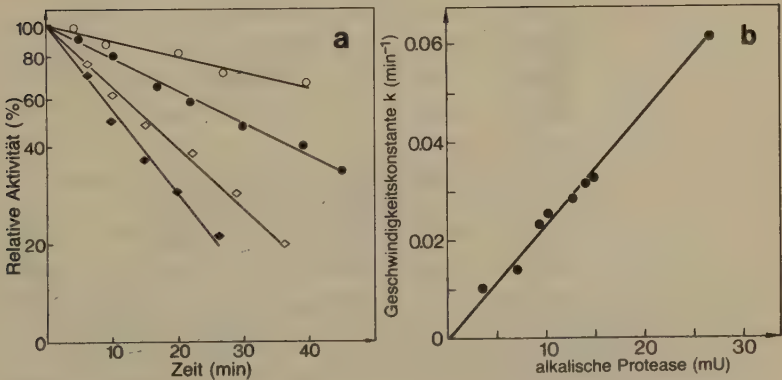


Abb. 28: Inaktivierung der Alkohol-Oxidase durch die alkalische Protease aus *Candida boidinii* bei pH 7.5 (a). Die Ansätze enthielten in 100 µl 0.59 U AOD und 3.6 mU (○), 9.6 mU (●), 22.6 mU (◇) bzw. 27.0 mU (◆) alkalische Protease. Die Inkubations-temperatur betrug 30 °C. Geschwindigkeitskonstante der AOD-Inaktivierung $k = (\ln c_0 - \ln c_t) / t$ in Abhängigkeit von der Aktivität der alkalischen Protease (b).

Es ist bekannt, daß einige Enzyme in vitro durch ihr Substrat gegenüber Proteolyse stabilisiert werden (Pine, 1972). Deshalb wurde untersucht, ob Methanol einen Einfluß auf die Inaktivierung der Alkohol-Oxidase durch die alkalische Protease hatte. Zu Ansätzen, die in einem Gesamtvolumen von 100 μ l 1 U Alkohol-Oxidase und 28 mU alkalische Protease bei pH 7.5 enthielten, wurden unterschiedliche Mengen Methanol gegeben und die Inaktivierung bei 30 °C verfolgt (Abb. 29).

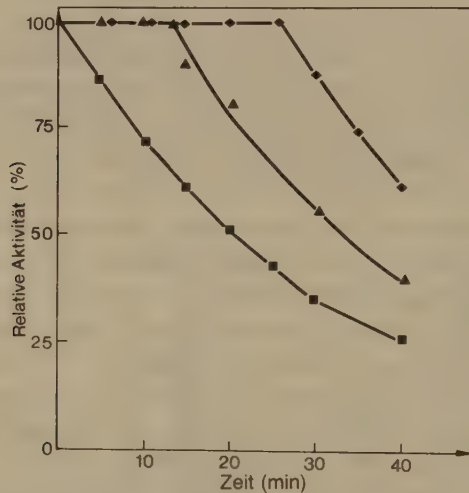


Abb. 29: Einfluß von Methanol auf die Inaktivierung der Alkohol-Oxidase durch die alkalische Protease. Ansatz ohne Methanol (■), mit 0.49, 1.47 bzw. 4.93 μ Mol (▲), mit 9.8 μ Mol (◆) Methanol.

Gegenüber der Kontrolle ohne Methanol wurde durch Methanol das Einsetzen der Inaktivierung der Alkohol-Oxidase um 13 bzw. 26 min verzögert. Während der Versuchsdauer blieb die Aktivität der alkalischen Protease in allen Ansätzen konstant. Um zu prüfen, ob diese Verzögerung mit

der vollständigen Oxidation des Methanols korreliert war, wurde die Menge des gebildeten Formaldehyds bestimmt. (Eine rechnerische Bestimmung des Methanol-Umsatzes über die eingesetzten Units Alkohol-Oxidase war nicht möglich, da die Aktivität der Alkohol-Oxidase von der Sauerstoffkonzentration abhängig ist und die Inaktivierungsansätze nicht mit Sauerstoff begast wurden.) Aus Tab. 9 geht hervor, daß beim Einsetzen der Inaktivierung der Alkohol-Oxidase noch 50 - 90% des eingesetzten Methanols vorlagen. Somit kann Methanol keine eindeutige Schutzfunktion beim proteolytischen Abbau der Alkohol-Oxidase zugesprochen werden; die verzögernde Wirkung von Methanol bleibt unverständlich.

Methanol ($\mu\text{Mol/Ansatz}$)	Formaldehyd ($\mu\text{Mol/Ansatz}$) nach	
	13 min	26 min
0.49	0.29	0.45
1.47	0.30	0.66
4.93	0.36	0.80
9.80	0.44	0.92

Tab. 9: Bildung von Formaldehyd in den Inaktivierungsansätzen (Abb. 29).

b) Einfluß der proteolytischen Enzyme auf die Aktivitäten von Alkohol-Oxidase und Katalase im Rohextrakt

Da die Katalase bei pH-Werten bis 5.0 gleichermaßen aktiv war wie bei 7.5, konnte der Einfluß der proteolytischen Enzyme auch bei niedrigen pH-Werten untersucht werden. Dies ist für Proteinase A bei pH 5.0 und 6.0 in Abb. 30 dargestellt. Im Vergleich zu den Aktivitätsverhältnissen im Rohextrakt wurde ein etwa dreifacher Überschuß an Proteinase A eingesetzt, wobei die relative Aktivität gegenüber Hämoglobin und Casein-Yellow bei den

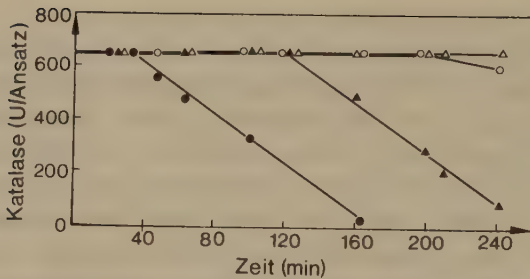


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der Katalase Aktivität im Rohextrakt von *Candida boidinii* unter Zusatz von Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* bei pH 5.0 (●) und 6.0 (▲). Die Ansätze (100 μ l) enthielten 60 U Proteinase A (Aktivität gegenüber Hämoglobin, pH 3.0). Die Kontrollansätze (○, △) ohne Proteinase A enthielten 5.5 U saure Protease. Inkubationstemperatur: 30 °C.

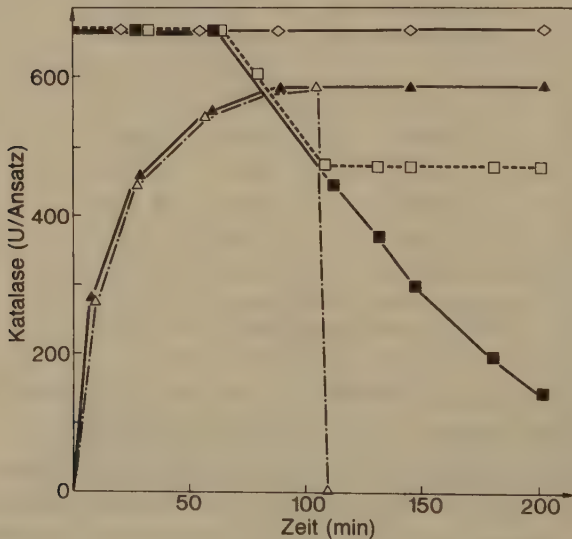


Abb. 31: Einfluß von Protease-Inhibitoren auf die Inaktivierung der Katalase im Rohextrakt unter Zusatz von Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* bei pH 5.0. Zu den Ansätzen 1 (■) und 2 (□) wurde nach 103 min Pepstatin (Endkonz.: 58.3 μ M), in Ansatz 2 nach 107 min I^B2 (1 μ l) gegeben. Kontrollansatz ohne Proteinase A und ohne Inhibitoren (◇). Aktivität der alkalischen Protease in 1 (▲) und 2 (△).

jeweiligen pH-Werten zugrunde gelegt wurde. In Kontroll-experimenten, in denen Proteinase A nach Einsetzen der Inaktivierung der Katalase durch Pepstatin inhibiert wurde, erfolgte keine Hemmung der Inaktivierung (Abb. 31). Demnach war die Inaktivierung der Katalase nicht auf eine direkte Wirkung von Proteinase A zurückzuführen. Eine Bestimmung der alkalischen Protease im Testansatz zeigte einen Aktivitätsanstieg mit Maximum zu Beginn der Inaktivierung der Katalase. Wenn die alkalische Protease durch den Inhibitor I^B₂ inhibiert wurde, blieb die Katalase Aktivität konstant (Abb. 31). Entsprechend den Versuchen mit Alkohol-Oxidase als Substrat hatte die saure Protease unter diesen Bedingungen keinen Einfluß auf die Katalase-Aktivität.

Weiterhin wurde der Einfluß des pH-Werts auf die Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme durch die alkalische Protease untersucht. Dazu wurde die Rohextraktherstellung in Phosphat-Puffer pH 6.2 vorgenommen und anschließend mit NaOH auf pH 7.1 und 8.1 gestellt. Infolge der irreversiblen Inaktivierung der Alkohol-Oxidase durch saure pH-Werte lag somit in diesen drei Proben jeweils an-

pH	Alkohol-Oxidase		Katalase	
	50% ige Inakti- vierung nach (min)	Restaktivi- tät nach 60' (%)	50% ige Inakti- vierung nach (min)	Restaktivi- tät nach 60' (%)
6.2	13	2	90	65
7.1	72	60	77	85
8.1	90	75	90	75 - 90

Tab. 10: Einfluß des pH-Werts auf die Inaktivierung der Alkohol-Oxidase und Katalase im Rohextrakt durch die alkalische Protease aus *Candida boidinii*. Die Ansätze enthielten 0.54 U AOD, 320 U Katalase und 21 mU Protease. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C.

nähernd 78% der Alkohol-Oxidase in inaktiver Form vor (Sahm und Wagner, 1973 a). Eine eindeutige Abhängigkeit der Inaktivierung vom pH-Wert bestand bei der Alkohol-Oxidase (Tab. 10). Gegenüber pH 7.1 und 8.1 erfolgte bei pH 6.2 eine rapide Inaktivierung. Die im Vergleich zu den Versuchen mit gereinigter Alkohol-Oxidase wesentlich langsamer ablaufende Inaktivierung im alkalischen pH-Bereich liegt wahrscheinlich darin begründet, daß im Rohextrakt sicher mehrere Proteine, einschließlich des inaktiven Alkohol-Oxidase Proteins, Substrate für die alkalische Protease waren. Die Inaktivierung der Katalase durch die alkalische Protease bei pH 7.1 und 8.1 war vergleichbar mit der der Alkohol-Oxidase. Jedoch fand bei pH 6.2 keine schnellere Inaktivierung statt.

III. DISKUSSION

In den Methanol-verwertenden Hefen *Candida boidinii* und *Hansenula polymorpha* werden die peroxisomalen Enzyme Alkohol-Oxidase und Katalase bei Übertragung Methanol gewachsener Zellen in ein Äthanol- bzw. Glucose-Medium nicht nur in ihrer Synthese reprimiert, sondern unterliegen einer irreversiblen Inaktivierung (Bormann, 1977; Veenhuis et al., 1978). Diese enzymatischen Veränderungen sind von einem Abbau der Peroxisomen begleitet. In *Candida boidinii* sind sechs Stunden nach Übertragung in ein Äthanol-Medium - einem Zeitpunkt, an dem das Zellwachstum beginnt - nahezu keine Alkohol-Oxidase Aktivität sowie kaum noch Peroxisomen vorhanden. Damit verfügt die Zelle über einen Regulationsmechanismus, der gegenüber der Repression mit anschließendem Ausverdünnen der Enzymaktivitäten durch Zellvermehrung eine wesentlich schnellere Anpassung an veränderte Umweltbedingungen ermöglicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß der Aktivitätsverlust der Alkohol-Oxidase auf einen Abbau des Enzymproteins zurückzuführen ist. Bei der Inaktivierung durch Äthanol tritt zusätzlich inaktives Protein auf, das wahrscheinlich durch Reaktion mit Acetaldehyd entsteht und deswegen in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit dem Abbau steht.

Der Abbau des Alkohol-Oxidase Proteins ist bei Auslösung durch Äthanol mit der Abnahme der durchschnittlichen Anzahl Peroxisomen pro Zelle korreliert. Gleichzeitig erfolgt eine Verringerung der Größe der Peroxisomen. Diese Beobachtung könnte methodisch bedingt sein, da, wenn wenige Peroxisomen vorhanden sind, die Wahrscheinlichkeit größer ist, daß diese nur angeschnitten werden und somit kleiner erscheinen. Andererseits wäre

aber auch denkbar, daß bevorzugt die großen Peroxisomen abgebaut werden. So berichten Veenhuis et al. (1978), daß bei Übertragung exponentieller Zellen von *Hansenula polymorpha*, die in der Regel einen kleinen und einen großen Peroxisom enthalten, der Abbau meist an dem großen Peroxisom beginnt. Auch scheint die im Vergleich zur Abnahme der durchschnittlichen Anzahl doppelt so große Abnahme der Volumendichte, die das Volumen aller Peroxisomen pro Zelle angibt, diese Vermutung zu unterstützen. Nach sechsständiger Inkubation von Methanol-Zellen von *Candida boidinii* in einem Äthanol-Medium sind aber zumeist weder große noch kleine Peroxisomen nachweisbar, wogegen in ein Glucose-Medium übertragene Zellen noch etwa drei kleine Peroxisomen (bis 0.5 μm im Durchmesser) enthalten. Da Glucose gewachsene Zellen auch kleine Peroxisomen enthalten (Roggenkamp, 1976), könnte es sich um neu gebildete Glucose-spezifische Peroxisomen oder aber um kleinere erhalten gebliebene Peroxisomen handeln. Für die letztere Möglichkeit spricht die sehr geringe Restmenge von Alkohol-Oxidase, die sechs Stunden nach Übertragung noch vorhanden ist. Auch ist eine Neusynthese der kleinen Peroxisomen innerhalb dieser Zeit fraglich, da ihnen keine bestimmte Funktion beim Glucose-Stoffwechsel zugesprochen werden kann, sondern ihr Vorhandensein eher einer nicht vollständigen Repression entspricht.

Der aktive Abbau des Alkohol-Oxidase Proteins (bzw. der Peroxisomen) verlangt das Vorhandensein von Proteasen in *Candida boidinii*. Proteasen werden nach ihrer Wirkungsspezifität in Endo- und Exopeptidasen unterteilt. Endopeptidasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen in der Mitte der Polypeptidkette des Substrats, während Exopeptidasen vom Molekülende Aminosäuren sequentiell abspalten - die Carboxypeptidasen C-terminale, die

Aminopeptidasen N-terminale Aminosäuren. Weiterhin ist eine Klassifizierung der Proteasen aufgrund ihrer Hemmbarkeit und dem Vorhandensein bestimmter Aminosäuren im aktiven Zentrum in saure Proteasen, Serin-Proteasen, Sulfhydryl- und Metallo-Proteasen üblich (Cunningham, 1965). Aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren proteolytisches System in den letzten Jahren besonders intensiv untersucht wurde (Wolf und Holzer, 1979), wurden zwei relativ unspezifische Endopeptidasen isoliert und charakterisiert: die Proteinase A, eine saure Protease (MG 60 000) mit einem pH-Optimum gegenüber säuredenaturiertem Hämoglobin bei 3.0 - 3.5, und die Proteinase B (MG 32 000 - 44 000), eine im neutralen und alkalischen Bereich aktive Serin-Protease mit für die Aktivität essentiellen(n) Sulfhydryl-Rest(en). Diese beiden Enzyme sind in der Vakuole der Hefezelle lokalisiert. Demgegenüber sind in *Saccharomyces carlsbergensis* mehrere proteolytische Enzyme, vermutlich Endopeptidasen, beschrieben, die in ihren Eigenschaften - beispielsweise zwei distinkte pH-Optima gegenüber Casein - nur wenig den aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannten Proteinasen ähneln (Maddox und Hough, 1970). Allerdings ist das proteolytische System dieses Organismus noch recht wenig verstanden. So wurden zwar die Proteinase-Inhibitoren I^A₂ und I^B₁ charakterisiert (Bünning et al., 1977, Bünning und Holzer, 1977), jedoch noch nicht die dadurch inhibierbaren Proteasen gefunden. Aus *Neurospora crassa* konnten eine saure Protease (MG 31 000) und eine alkalische Serin-Protease (MG 24 000) isoliert werden, die gegenüber generellen Protease-Substraten pH-Optima haben, wie sie für die entsprechenden Enzyme aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben sind. Diese Enzyme sind in Vesikeln lokalisiert, die vermutlich Vorstufen von Vakuolen darstellen (Heiniger und Matile, 1974; Martinoia et al., 1979).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß auch in der Methanol-verwertenden Hefe *Candida boidinii*

eine saure Protease und eine alkalische Serin-Protease vorhanden sind. Diese beiden Proteasen ähneln den Proteinase A und B aus *Saccharomyces cerevisiae* in mehreren Eigenschaften. Hervorzuheben ist die Reaktion der Proteinase-Inhibitoren I^A_3 und I^B_2 aus *Saccharomyces cerevisiae* mit den entsprechenden Proteasen aus *Candida boidinii*. Der Inhibitor I^A_3 wurde bislang als spezifisch für Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben und reagiert beispielsweise nicht mit der sauren Protease Pepsin (Saheki et al., 1974). Das gleiche gilt für I^B_2 , von dem bisher nur eine Reaktion mit Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannt ist (Betz et al., 1974).

Die angereicherte alkalische Protease aus *Candida boidinii* baut in vitro die Alkohol-Oxidase als auch die Katalase ab. Entsprechend der großen Ähnlichkeit mit der alkalischen Protease aus *Candida boidinii* verdaut auch Proteinase B aus *Saccharomyces cerevisiae* die Alkohol-Oxidase. Dagegen zeigen die saure Protease aus *Candida boidinii* sowie Proteinase A und Carboxypeptidase aus *Saccharomyces cerevisiae* keine Aktivität gegenüber Alkohol-Oxidase und Katalase, auch wenn sie zu den im Rohextrakt bestimmten Verhältnissen im Überschuß vorliegen.

Der Abbau der Alkohol-Oxidase verläuft als eine Reaktion erster Ordnung hinsichtlich der eingesetzten Alkohol-Oxidase Menge. Dies könnte die Grundlage für den in vivo bestimmten annähernd exponentiellen Inaktivierungsverlauf der Alkohol-Oxidase sein. Ferner ist, entsprechend dieser Abbaukinetik, der erhöhte Abbau in stationären Methanol-Zellen nicht nur durch die erhöhten Protease Aktivitäten solcher Zellen bedingt, sondern auch durch die große Alkohol-Oxidase Menge stationärer Zellen (Eggeling, 1976).

Abbaukinetiken erster Ordnung wurden bisher für alle mittels Isotopenmarkierung untersuchten Proteine im Lebergewebe von Säugetieren gefunden (Schimke, 1973).

Demzufolge ist der proteolytische Abbau ein zufälliger Prozess, der sowohl neu synthetisierte als auch 'ältere' Moleküle gleichermaßen erfaßt. Es erscheint somit unwahrscheinlich, daß ein Enzym seine Konformation durch den Katalysevorgang verändert und im 'gealterten' Zustand als Substrat von Proteasen erkannt wird (Schimke und Doyle, 1970).

Als Erkennungssignal für den proteolytischen Abbau werden Veränderungen des abzubauenden Proteins, wie etwa im Ladungszustand, der Oberflächenhydrophobität oder auch der Verlust eines Coenzyms diskutiert (Holzer und Heinrich, 1980). In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, daß die Alkohol-Oxidase bei pH-Werten < 7.0 wesentlich schneller abgebaut wird als im alkalischen, dem für die Aktivität optimalen Bereich. Dieser schnellere Abbau mag auf eine teilweise Entfaltung der Alkohol-Oxidase bei sauren pH-Werten zurückzuführen sein, sodaß eine Protease-empfindliche Konformation vorliegt. Im allgemeinen treten beim Denaturierungsvorgang hydrophobe Reste, die den Kern vieler Proteine stabilisieren, an die Oberfläche (Kahl, 1979). Dadurch wird ein rascher Abbau begünstigt, da die meisten intrazellulären Proteasen bevorzugt Peptidbindungen zwischen hydrophoben Resten spalten (Bohley et al., 1979). Auch ist denkbar, daß niedrige pH-Werte die Dissoziation des FAD, der prosthetischen Gruppe der Alkohol-Oxidase, fördern (Hemmrich, pers. Mitteilung) und so eine für die Protease günstigere Angriffsmöglichkeit entsteht. Solch eine erhöhte Sensitivität ist für die Tryptophan-Synthetase beschrieben, die in vitro ohne Pyridoxalphosphat wesentlich empfindlicher gegenüber den Proteinasen A und B aus *Saccharomyces cerevisiae* ist als das Holo-Enzym (Schött und Holzer, 1974).

Zur Beantwortung der Frage, inwieweit pH-Veränderungen in vivo bei der Proteolyse der Alkohol-Oxidase beteiligt sind, ist allerdings die Bestimmung des pH-Werts der Zelle

unter besonderer Berücksichtigung ihrer Kompartimente Voraussetzung.

Aussagen über die in vivo-Funktion einer Protease anhand von vitro-Experimenten sind zusätzlich dadurch erschwert, daß letztlich nicht nur die Spezifität einer Protease hinsichtlich der Peptidspaltung zwischen bestimmten Aminosäuren darüber bestimmt, ob Proteolyse eintritt oder nicht, sondern ebenso deren Sekundärspezifität, die Fähigkeit, Proteine zu erkennen und korrekt zu binden (Wolf, 1980 a). Diese makromolekularen Erkennungsoberfläche der Protease liegt außerhalb des aktiven Zentrums und reagiert nur mit Proteinen komplementärer Struktur. Es ist also vorstellbar, daß unter in vitro-Verhältnissen nicht nur das Substrat verändert vorliegt, sondern ebenso die Sekundärspezifität der Protease verändert ist und diese Proteine bindet, die ihr in vivo unzugänglich wären. So haben Untersuchungen an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, daß der Abbau einiger Enzyme, der in vitro durch Proteinase B katalysiert wird, in vivo nicht durch Proteinase B bestimmt werden kann. Cabib und Mitarbeiter hatten dieser Proteinase eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Zymogenform der Chitin-Synthetase, eines für die Knospung der Hefezellen erforderlichen Enzyms, zugeschrieben (Cabib, 1976). Ebenso führte die hohe Sensivität einiger katabolit-inaktivierbarer Enzyme gegenüber Proteinase B zu der Annahme, daß dieses Enzym auch in vivo bei den Inaktivierungsvorgängen involviert sein könnte (Holzer, 1976). Jedoch konnte kürzlich mit Mutanten ohne Proteinase B Aktivität gezeigt werden, daß diese Organismen ganz normal wachsen und knospen und in vivo gegenüber Widtyp-Zellen eine unveränderte Katabolit-Inaktivierung von cytoplasmatischer Malat-Dehydrogenase, Fructose-1,6-bisphosphatase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase stattfindet, während diese Vorgänge in vitro nicht mehr durch Mutantenextrakt

ausgelöst werden (Wolf und Ehmann, 1979; Zubenko et al., 1979; Zubenko und Jones, 1979). Somit ist Proteinase B vermutlich nicht an den primären Ereignissen dieser Prozesse beteiligt. Die Reduktion der Sporulationshäufigkeit und des Protein-Turnovers in ruhenden Zellen von Proteinase B⁻-Mutanten weist auf eine Funktion der Proteinase B bei der Bereitstellung von Aminosäuren für Proteinsynthese unter Mangelbedingungen hin.

Bedingt durch den Nachweis der bisher beschriebenen proteolytischen Enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* als auch der sauren und alkalischen Protease aus *Candida boidinii* muß es sich um Enzyme mit breiter Substratspezifität handeln; denn die Aktivität dieser Enzyme wird mit unphysiologischen Substraten (Hämoglobin, Casein, Azocoll) bestimmt. Auch dies deutet darauf hin, daß diese Enzyme in vivo Prozesse katalysieren, die eine breite Substratspezifität erfordern. Es könnten noch andere, unbekannte Proteasen mit höherer Spezifität für spezielle proteolytische Prozesse existieren. So fanden erst kürzlich Wolf und Mitarbeiter (1980 b) bei der Analyse von Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* zusätzlich zu den bisher charakterisierten, sieben proteolytischen Enzymen neue Protease-Aktivitäten: elf lösliche und mindestens zwei membrangebundene Endopeptidasen und vier Carboxypeptidasen. Das bisher bekannte proteolytische System in *Saccharomyces cerevisiae* stellt demnach vermutlich die 'Spitze eines Eisberges' dar. Spezifische Proteolyse bestimmter Zellproteine oder -strukturen durch noch unbekannte Enzyme muß somit in Betracht gezogen werden.

Ausgehend von den bisher bekannten Befunden ist ein Großteil der Proteasen in den Vakuolen lokalisiert und somit von seinen Substraten getrennt (Matile, 1978). Demnach könnte die Regulation proteolytischer Prozesse

auch auf höherer Ebene, durch Wechselwirkung zwischen Enzymen und Organellen, erfolgen. Während die katabolit-inaktivierbaren Enzyme in löslicher Form im Cytoplasma vorliegen, ist die Alkohol-Oxidase in Peroxisomen lokalisiert, die ebenfalls der Degradation unterliegen. Wenn Peroxisomen durch vakuoläre Enzyme abgebaut werden, müßte hier eine zusätzliche Membranbarriere überwunden werden. Eine Möglichkeit wäre das Verschmelzen von Zellvakuole und Peroxisomen. Eine direkte Verbindung zwischen diesen Partikeln konnte weder in *Candida boidinii* innerhalb dieser Arbeit noch in *Hansenula polymorpha* (Veenhuis et al., 1978) beobachtet werden. Auch in tierischen Zellen konnte kein Verschmelzen von Lysosomen mit Mitochondrien, Komponenten des endoplasmatischen Retikulums oder Mikrobodies gefunden werden, wohingegen die Fusion gleicher Strukturen bei Lysosomen, Mitochondrien oder endoplasmatischer Strukturen ein generelles Phänomen ist (De Duve und Wattiaux, 1966).

Neben dem direkten Verschmelzen wäre Phagocytose der Peroxisomen durch die Vakuole vorstellbar. So werden in *Saccharomyces cerevisiae* in der stationären Wachstumsphase Lipidkörper durch Invagination des Tonoplasts in die Vakuole aufgenommen und liegen dort als Membranium umgrenzte Vesikel vor (Moeller und Thomson, 1979). Hinweise auf entsprechende Vorgänge in *Candida boidinii* konnten im Verlauf dieser Arbeit wie auch für *Hansenula polymorpha* (Veenhuis et al., 1978) nicht gefunden werden. Im Widerspruch dazu vermuten Meisel et al. (1979), daß die Peroxisomen als Gruppe in die Vakuole gelangen können. Da die Ergebnisse aber an lichtmikroskopischen Phasenkontrast-Untersuchungen gewonnen wurden und auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen kaum Membranstrukturen erkennbar sind, müßte diese Beobachtung jedoch überprüft werden.

Eine dritte Möglichkeit, diese Membranbarrieren zu überwinden, könnte der aktive Transport der proteolytischen Enzyme von der Vakuole in die Peroxisomen sein.

Die für die Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme erforderliche Energie mag für solche Prozesse sprechen. Auch die elektronenmikroskopischen Ergebnisse von Veenhuis et al. (1978) an *Hansenula polymorpha* sowie die eigenen an *Candida boidinii* weisen auf einen Abbau der peroxisomalen Enzyme innerhalb der Peroxisomen hin, wie das Auftreten von 'Löchern' innerhalb der Peroxisomen und vakuolärer Strukturen, die desintegrierten Peroxisomen gleichen. Für einen Transport proteolytischer Enzyme durch die Peroxisomenmembran sprechen auch Membranveränderungen. In *Hansenula polymorpha* nimmt während des Glucose induzierten Abbaus die Peroxisomenmembran von 70 Å auf 90 Å Breite zu und verändert sich von glatter zu rauher Oberfläche (Veenhuis et al., 1978).

Untersuchungen der Peroxisomenmembran während der Desintegration könnten somit weitere Hinweise zum Mechanismus des Peroxisomenabbaus erbringen, obwohl es wahrscheinlich schwierig sein wird zu zeigen, ob Membranveränderungen den Abbau auslösen oder Folge des Abbaus sind.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der Hefe *Candida boidinii* erfolgt bei Übertragung Methanol gewachsener Zellen in ein Äthanol- oder Glucose-Medium ein Abbau der Peroxisomen. Nach sechsständiger Inkubation in einem Äthanol-Medium sind in den Zellen nahezu keine Peroxisomen mehr vorhanden, in einem Glucose-Medium durchschnittlich drei kleine (bis $0.5\ \mu\text{m}$ Durchmesser). Während des Abbaus sind vakuoläre Strukturen zu beobachten, die desintegrierten Peroxisomen gleichen.
2. Die ultrastrukturellen Veränderungen sind begleitet von einer Inaktivierung der peroxisomalen Enzyme Alkohol-Oxidase und Katalase, die bei Übertragung in ein Äthanol-Medium annähernd doppelt so groß ist wie in einem Glucose-Medium. Die durch Glucose induzierten Enzyminaktivierungen verlaufen in stationären Methanol-Zellen schneller als in exponentiellen Zellen. Für die Inaktivierung von Alkohol-Oxidase und Katalase ist ATP erforderlich.
3. Die Inaktivierung der Alkohol-Oxidase ist durch proteolytischen Abbau bedingt, der bei Auslösung durch Glucose mit dem Verlust an katalytischer Aktivität einhergeht. Demgegenüber ist in Zellen, die in ein Äthanol-Medium übertragen werden, inaktives Alkohol-Oxidase Protein nachweisbar, das aufgrund der Sedimentation im Saccharose-Dichtegradienten, gelelektrophoretischer Eigenschaften sowie des isoelektrischen Punkts und antigener Eigenschaften nicht vom aktiven Enzym zu unterscheiden ist. Die Hemmbarkeit der Alkohol-Oxidase durch Acetaldehyd in vitro läßt eine in vivo Inaktivierung durch den bei der Oxidation des Äthanol durch die Alkohol-Oxidase entstehenden Acetaldehyd vermuten.

4. Untersuchungen bezüglich des proteolytischen Systems ergaben, daß in *Candida boidinii* eine saure, durch Pepstatin inhibierbare Protease, eine alkalische Serin-Protease mit für die Aktivität essentiell(em) Sulfhydrylrest(en) und eine Carboxypeptidase mit essentiellen Serin- und Sulfhydrylresten vorhanden sind. In Rohextrakten sind die Aktivitäten dieser Enzyme nicht oder nur teilweise meßbar, was vermutlich durch die Bildung inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplexe - wie auch bei *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben - zurückzuführen ist. Als optimale Aktivierungsbedingungen erwiesen sich Inkubation der Rohextrakte bei Raumtemperatur 24 h mit 3M Harnstoff pH 6.0 für die saure Protease, mit 0.67 % SDS und 20 % Glycerin pH 7.0, 6-30 h für die alkalische Protease bzw. 1 h für die Carboxypeptidase. Die angereicherte saure Protease hydrolysiert HCl-Hämoglobin optimal bei pH 3.5, die alkalische Protease Azocoll bei 7.0 - 9.5 und Casein-Yellow bei 9 - 10. Die saure und alkalische Protease werden durch die Inhibitoren I^A₃ bzw. I^B₂ aus *Saccharomyces cerevisiae* inhibiert.
5. In vitro haben die saure Protease aus *Candida boidinii* und Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* - in Aktivitätsverhältnissen, wie sie in Rohextrakten bestimmt wurden - keinen Einfluß auf die Aktivitäten von Alkohol-Oxidase und Katalase. Demgegenüber werden Alkohol-Oxidase und Katalase von der alkalischen Protease verdaut, und zwar im Fall der Alkohol-Oxidase bei sauren pH-Werten wesentlich schneller als bei alkalischen pH-Werten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Aibara, S., Hayashi, R., Hata, T. (1971): Physical and Chemical Properties of Yeast Proteinase C. *Agr. Biol. Chem.* 35, 658-666
- Afting, E.-G., Lynen, A., Hinze, H., Holzer, H. (1976): Effects of Yeast Proteinase A, Proteinase B and Carboxypeptidase Y on Yeast Phosphofructokinase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1771-1777
- Babel, W., Löffhagen, N. (1979): Assimilation of methanol by yeasts a new approach. *Zeitschr. Allg. Mikrobiol.* 19, 299-302
- Ballard, F.J. (1977): Intracellular Protein Degradation. *Essays Biochem.* 13, 1-36
- Barth, R., Wolf, H.D., Holzer, H. (1978): Studies On The Carboxypeptidase Y-Inhibitor Complex Of Yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 527, 63-69
- Bensadoun, A., Weinstein, D. (1976): Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* 70, 241-250
- Bergmeyer, H.-U., Gawehn, K., Graßl, H. (1974): Methoden der enzymatischen Analyse I, 714-715
- Betz, H., Hinze, H., Holzer, H. (1974): Isolation and Properties of Two Inhibitors of Proteinase B from Yeast. *J. Biol. Chem.* 249, 4515-4521
- Betz, H., Weiser, U. (1976): Protein Degradation and Proteinases during Yeast Sporulation. *Eur. J. Biochem.* 62, 65-76
- Bogóñez, E., Satrústegui, J., Machado, A. (1979): Evidence for Degradation in the Carbon-Starvation Induced Inactivation of Yeast NADP-Glutamat Dehydrogenase. *FEMS Lett.* 6, 151-154

- Bohley, P., Riemann, S. (1977): Intracellular protein catabolism. IX. Hydrophobicity of substrate proteins is a molecular basis of selectivity. *Acta biol. med. germ.* 36, 1823-1827
- Bohley, P., Kirschke, H., Langner, J., Miede, M., Riemann, S., Salama, Z., Schön, E., Wiederanders, B., Ansorge, S. (1979): Intracellular Protein Turnover. In: *Biological Functions of Proteinases*, 17-34. Hrg.: Holzer, H., Tschesche, H., Springer Verlag
- Bormann, C. (1977): Untersuchungen Zur Regulation Der Katalase In Der Methanol Verwertenden Hefe *Candida Boidinii*. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig
- Boyer, P.D. (1954): Spectrometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials. *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 4331-4337
- Bringer, S., Sprey, B., Sahm, H. (1979): Purification and Properties of Alcohol Oxidase from *Poria contigua*. *Eur. J. Biochem.* 101, 563-570
- Brown, H.D., Satyanarayana, T., Umbarger, H.E. (1975): Biosynthesis of Branched-Chain Amino Acids in Yeast: Effect of Carbon Source on Leucine Biosynthetic Enzymes. *J. Bacteriol.* 121, 959-969
- Bünning, P., Holzer, H. (1977): Natural Occurrence and Chemical Modification of Proteinase B Inhibitors from Yeast. *J. Biol. Chem.* 252, 5316-5323
- Bünning, P., Meußdoerffer, F., Holzer, H. (1977): Proteinase A-Inhibitors from Yeast and their Application for Affinity Chromatography of Proteinase A. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1186-1187
- Cabib, E., Farkas, V. (1971): The Control of Morphogenesis: An Enzymatic Mechanism for the Initiation of Septum Formation in Yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2052-2056

- Cabib, E., Ulane, R., Bowers, B. (1973): Yeast Chitin Synthetase. Separation Of The Zymogen From Its Activating Factor And Recovery Of The Latter In The Vacuole Fraction. J. Biol. Chem. 248, 1451-1458
- Cabib, E. (1976): The Yeast primary septum: a journey into three-dimensional biochemistry. Trends in Biochemical Sciences 1, 275-277
- O'Connor, M.L., Quayle, J.R. (1979): Mutants of *Hansenula polymorpha* and *Candida boidinii* Impaired in their Ability to Grow on Methanol. J. Gen. Microbiol. 113, 203-208
- Cunningham, L. (1965): The Structure and Mechanism of Proteolytic Enzymes. In: Comprehensive Biochemistry 16, 85-188. Hrg.: Florkin, M., Stoltz, E.H., Elsevier Publishing Company
- Davie, E.W., Fujikawa, K., Kurachi, K. (1979): Blood Coagulation. In: Biological Functions of Proteinases, 238-242. Hrg.: Holzer, H., Tschesche, H. Springer Verlag
- van Dijken, J.P., Otto, R., Harder, W. (1975 a): Oxidation of Methanol, Formaldehyde and Formate by Catalase Purified from Methanol-Grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol. 106, 221-226
- van Dijken, J.P., Veenhuis, M., Kreger-van Rji, N.J.W., Harder, W. (1975 b): Microbodies in the Methanol-Assimilating Yeasts. Arch. Microbiol. 102, 41-44
- van Dijken, J.P., Harder, W., Beardsmore, A.J., Quayle, J.R. (1978): Dihydroxyacetone: An Intermediate In The Assimilation Of Methanol By Yeasts. FEMS Microbiol. Lett. 4, 97-102
- Doi, E., Hayashi, R., Hata, T. (1967): Purification of Yeast Proteinases. Part II. Purification and Some Properties of Yeast Proteinase C. Agr. Biol. Chem. 31, 160-169

- Mc Donald, C.E., Chen, L.L. (1965): The Lowry Modification of the Folin Reagent for Determination of Proteinase Activity. Anal. Biochem. 10, 175-177
- De Duve, C., Wattiaux, R. (1966): Functions of Lysosomes. Ann. Rev. Physiol. 28, 435-492
- Eggeling, L. (1976): Untersuchungen Zur Regulation Der Flavinsynthese In *Candida Boidinii*. Dissertation. Technische Universität Braunschweig
- Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971): Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. Biochemistry 10, 2606-2617
- Ferguson, J.J., Boll, Jr. M., Holzer, H. (1967): Yeast Malate Dehydrogenase: Enzyme Inactivation In Catabolite Repression. European. J. Biochem. 1, 21-25
- Ferguson, A.R., Sims, A.P. (1974): The Regulation of Glutamine Metabolism in *Candida utilis*: the Inactivation of Glutamin Synthetase. J. Gen Microbiol. 80, 173-185
- Frisch, L. (1961): Cellular Regulatory Mechanisms XXVI, Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology. Waverly Press, INC., Baltimore, Maryland, USA
- Fujii, T., Tonomura, K. (1975): Oxidation of Methanol and Formaldehyde by a System Containing Alcohol Oxidase and Catalase Purified from *Candida sp.* N-16. Agr. Biol. 39, 2325-2330
- Fukui, S., Tanaka, A., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Teranishi, Y., Osumi, M. (1975): Ultrastructure of Methanol Utilizing Yeast Cells: Appearance of Microbodies in Relation to High Catalase Activity. J. Bacteriol. 123, 317-328

- Gancedo, C. (1971): Inactivation of Fructose-1,6-Diphosphatase by Glucose in Yeast. *J. Bacteriol.* 107, 401-405
- Gancedo, C., Schwerzmann, K. (1976): Inactivation by Glucose of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 109, 221-225
- Gold, A.M. (1967): Sulfonylation with Sulfonyl Halides. In: *Methods in Enzymology XI*, 706-711. Hrg.: Hirs, C.H.W., Academic Press
- Goldberg, A.L., Dice, J.F. (1974): Intracellular Protein Degradation In Mammalian And Bacterial Cells. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 835-869
- Goldberg, A.L., John, A.C.ST. (1976): Intracellular Protein Degradation In Mammalian And Bacterial Cells: Part 2. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 747-803
- Goldsby, R.A., Heytler, P.G. (1963): Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone on Mitochondrial Respiration. *Biochem.* 2, 1142-1147
- Görts, C.P.M. (1969): Effect of Glucose On The Activity And The Kinetics Of The Maltose-Uptake System And Of α -Glucosidase In *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 184, 299-305
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949): Determination Of Serum Proteins By Means Of The Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766
- Grisolia, S. (1964): The Catalytic Environment and its Biological Implications. *Physiol. Rev.* 44, 657-712
- Haarasilta, S., Oura, E. (1975): On the Activity and Regulation of Anaplerotic and Gluconeogenetic Enzymes during Growth Process of Baker's Yeast. The Biphasic Growth. *Eur. J. Biochem.* 52, 1-7

- Halvorson, H. (1958 a): Intracellular Protein And Nucleic Acid Turnover In Resting Yeast Cells. Biochim. Biophys. Acta 27, 255-266
- Halvorson, H. (1958 b): Studies On Protein And Nucleic Acid Turnover In Growing Cultures Of Yeast. Biochim. Biophys. Acta 27, 267-276
- Hansen, R.J., Switzer, R.L., Hinze, H., Holzer, H. (1977): Effects Of Glucose And Nitrogen Source On The Levels of Proteinases, Peptidases, And Proteinase Inhibitors In Yeast. Biochim. Biophys. Acta 496, 103-114
- Hasilik, A., Müller, H., Holzer, H. (1974): Compartmentation of the Tryptophan-Synthetase-Proteolyzing System in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 48, 111-117
- Hata, T., Hayashi, R., Doi, E. (1967 a): Purification of Yeast Proteinases. Part III. Isolation and Physicochemical Properties of Yeast Proteinase A and C. Agr. Biol. Chem. 31, 357-367
- Hata, T., Hayashi, R., Doi, E. (1967 b): Purification of Yeast Proteinases. Part I. Fractionation and Some Properties of the Proteinases. Agr. Biol. Chem. 31, 150-159
- Hayashi, R., Oka, Y., Doi, E., Hata, T. (1968): Activation of Intracellular Proteinases of Yeast. Part I. Occurrences of Inactive Precursors of Proteinases B. Agr. Biol. Chem. 32, 359-366
- Hayashi, R., Hata, T. (1972): Yeast Pro-proteinase C. Part IV. Activation by Yeast Proteinase A and Activation Mechanism. Agr. Biol. Chem. 36, 630-638
- Hayashi, R., Minami, Y., Hata, T. (1972): Yeast Pro-proteinase C. Part III. The Activation by Protein Denaturants. Agr. Biol. Chem. 36, 621-629

- Heiniger, U., Matile, Ph. (1974): Protease Secretion In *Neurospora Crassa*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 1425-1432
- Hemmings, B.A. (1978): Evidence for the Degradation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Glutamate Dehydrogenase of *Candida utilis*. During Rapid Enzyme Inactivation. J. Bacteriol. 133, 867-877
- Heytler, P.G. (1963): Uncoupling of Oxidative Phosphorylation. I. Some Characteristics of Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine on Mitochondria and Chloroplasts. Biochem. 2, 357-361
- Hinze, H., Betz, H., Saheki, T., Holzer, H. (1975): Formation of a Complex between Yeast Proteinases A and B. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1259-1264
- Holzer, H., Duntze, W. (1971): Metabolic Regulation By Chemical Modification Of Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 40, 345-374
- Holzer, H. (1975): Chemistry And Biology Of Macromolecular Inhibitors From Yeast Acting On Proteinases A and B, And Carboxypeptidase Y. Advances in Enzyme Regulation 13, 125-134, Pergamon Press
- Holzer, H., Betz, H., Ebner, E. (1975): Intracellular Proteinases in Microorganisms. Curr. Top. Cell. Regul. 9, 103-156
- Holzer, H. (1976): Catabolite Inactivation in yeast. Trends in Biochemical Sciences. 1, 178-181
- Holzer, H. (1978): Control Of Proteolysis In Yeast. Proceedings of the Symposium on Protein Turnover and Lysosomal Function, 305-314. Academic Press, New York
- Holzer, H., Heinrich, P.C. (1980): Control Of Proteolysis. Ann. Rev. Biochem. 49, 63-91

- Hynes, M.J. (1974): The Effects of the Carbon Source on Glutamate Dehydrogenase Activities in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 81, 165-170
- Jacoby, W.B. (1963): Aldehyde Dehydrogenases. In: The Enzymes 7, 203-221. Hrg.: Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K., Academic Press, New York, London
- John, P.C.L., Thurston, C.F., Syrett, P.J. (1970): Disappearance of Isocitrate Lyase Enzyme from Cells of *Chlorella pyrenoidosa*. Biochem. J. 119, 913-919
- Jones, E.W. (1977): Proteinase Mutants Of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 85, 23-33
- Jovin, T.A., Chrambeck, A., Naughton, M.A. (1964): An apparatus for preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 8, 351-369
- Jušić, M., Hinze, H., Holzer, H. (1976): Inactivation of Yeast Enzymes by Proteinase A and B and Carboxypeptidase Y from Yeast. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 735-740
- Kahl, G. (1979): Mechanismen des intracellulären Enzymabbaus. Naturwissenschaftl. Rundschau 32, 273-289
- Kato, N., Omori, Y., Tani, Y., Ogata, K. (1976): Alcohol Oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. Catalytic Properties and Subunit Structures. Eur. J. Biochem. 64, 341-350
- Kato, N., Nishizawa, T., Sakazawa, C., Tani, Y., Yamada, H. (1979): Xylulose 6-phosphate-dependent Fixation of Formaldehyde in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No 2201. Agr. Biol. Chem. 43, 2013-2015

- Klar, A.J.S., Halvorson, H.O. (1975): Proteinase Activities of *Saccharomyces cerevisiae*. During Sporulation. J. Bacteriol. 124, 863-869
- Kinghorn, J.R., Pateman, J.A. (1974): The Effect of the Carbon Source on Ammonium Regulation in *Aspergillus nidulans*. Molec. gen. Genet. 128, 95-98
- Kreger-van Rij, N.J.W., Veenhuis, M. (1971): A Comparative Study of the Cell Wall Structure of Basidiomycetous and Related Yeasts. J. Gen. Microbiol. 68, 87-95
- Kuehn, G.D., Mc Fadden, B.A. (1968): Factors Affecting the Synthesis and Degradation of Ribulose-1,5-Diphosphate Carboxylase in *Hydrogenomonas facilis* and *Hydrogenomonas eutropha*. J. Bacteriol. 95, 937-946
- Lenney, J.F. (1956): A Study Of Two Yeast Proteinases. J. Biol. Chem. 221, 919-930
- Lenney, J.F., Dalbec, J.M. (1969): Yeast Proteinase B: Identification of the Inactive Form as an Enzyme-Inhibitor Complex. Arch. Biochem. Biophys. 129, 407-409
- Lenney, J., Matile, P., Wiemken, A., Schellenberger, M., Meyer, J. (1974): Activities and cellular localization of yeast proteases and their inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 1378-1383
- Lenney, J.F. (1975): Three Yeast Proteins That Specifically Inhibit Yeast Proteases A, B, and C. J. Bacteriol. 122, 1265-1273
- Lewis, C.M., Fincham, J.R.S. (1970): Regulation of Nitrate Reductase in the Basidiomycete *Ustilago maydis*. J. Bacteriol. 103, 55-61
- Liedtke, M.P., Ohmann, E. (1969): Eigenschaften und Regulation einer Phosphatase in *Euglena gracilis*, Synthese und Inaktivierung. Eur. J. Biochem. 10, 539-548

- LKB Application Note 250 (1977): Analytical Electro-focussing in Thin Layers of Polyacrylamid Gels
- López, S., Gancedo, J.M. (1979): Effect of Metabolic Conditions on Protein Turnover in Yeast. *Biochem. J.* 178, 769-776
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Maddox, I.S., Hough, J.S. (1970): Proteolytic Enzymes of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. J.* 117, 843-852
- Magni , G., Santarelli, I., Natalini, P., Ruggieri, S., Vita, S. (1977): Catabolite Inactivation of Bakers'-Yeast Uridine Nucleosidase. Isolation and Partial Purification of a Specific Proteolytic Inactivase. *Eur. J. Biochem.* 75, 77-82
- Magni , G., Pallotta, G., Natalini, P., Ruggieri, S., Santarelli, I., Vita, A. (1978): Inactivation of Uridine Nucleosidase in Yeast. Purification And Properties Of An Inactivating Protein. *J. Bacteriol.* 253, 2501-2503
- Mandelstam, J. (1963): Protein Turnover And Its Function In the Economy Of The Cell. *Ann. New York Acad. Sci.* 102, 621-636
- Martinoia, E., Heck, U., Boller, Th., Wiemken, A., Matile, P. (1979): Some Properties of Vacuoles Isolated from *Neurospora crassa* Slime Variant. *Arch. Microbiol.* 120, 31-34
- Matern, H., Holzer, H. (1977): Catabolite Inactivation of the Galactose Uptake System in Yeast. *J. Biol. Chem.* 252, 6399-6402
- Matile, P., Wiemken, A. (1967): The Vacuole as the Lysosome of the Yeast Cell. *Arch. Microbiol.* 56, 148-155
- Matile, P. (1978): Biochemistry And Functions Of Vacuoles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 193-213

- May, R. (1974): Verbesserung der Glutaraldehyd-OsO₄-
Fixierung von Hefen durch Vorfixierung mit
Formaldehyd und enzymatischen Zellwandabbau.
Zeitschrift allgem. Mikrobiol. 14, 161-166
- Mazón, M.J. (1978): Effect of Glucose Starvation on
the Nicotin Adenin Dinucleotide Phosphate-Depen-
dent Glutamat Dehydrogenase of Yeast. J. Bacteriol.
133, 780-785
- Meisel, M.N., Medvedeva, G.A., Kozlova, T.M.,
Pomoshchnikova, N.A., Novichkova, A.T. (1979):
Formation And Degradation Of Peroxisomes In
Yeast Organisms. Microbiology, 47, 836-844
- Moeller, C.H., Thomson, W., (1979): Uptake of Lipid
Bodies by the Yeast Vacuole Involving Areas of
the Tonoplast Depleted of Intramembranous
Particles. J. Ultrastruc. Res. 68, 38-45
- Molano, J., Gancedo, C. (1974): Specific Inactivation
of Fructose 1, 6-Bisphosphatase from *Saccharomy-
ces cerevisiae* by a Yeast Protease. Eur. J. Bio-
chem. 44, 213-217
- Nash, T. (1953): The Colorimetric Estimation of
Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction,
Biochem. J. 55, 416-421
- Neeff, J. (1974): Untersuchungen zur Glukose abhängi-
gen Inaktivierung der Malatdehydrogenase in
Saccharomyces cerevisiae. Dissertation, Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg, i. Br.
- Neeff, J., Hägele, E., Nauhaus, J., Heer, U., Mecke, D.
(1978): Evidence for Catabolite Degradation in
the Glucose-Dependent Inactivation of Yeast
Cytoplasmic Malate Dehydrogenase. Eur. J.
Biochem. 87, 489-495
- Osumi, M., Miwa, N., Teranishi, B., Tanaka, A.,
Fukui, S. (1975): Development of microbodies
in *Candida tropicalis* during incubation in a
n-alkan medium. Arch. Microbiol. 103, 1-11

- Ouchterlony, Ö. (1958): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progress in Allergy V, 1-78
- Pine, M.R. (1965): Heterogeneity of Protein Turnover in Microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 104, 439-456
- Pine, M.J. (1966): Metabolic Control of Intracellular Proteolysis in Growing and Resting Cells of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 92, 847-850
- Pine, M.J. (1972): Turnover Of Intracellular Proteins. Ann. Rev. Microbiol. 26, 103-126
- Poole, B.Ph.D. (1969): Biogenesis And Turnover Of Rat Liver Peroxisomes. Ann. New York Acad. Sci. 168, 229-243
- Rechigl, M.Jr. (1971): Intracellular Protein Turnover and the Roles of Synthesis and Degradation in Regulation of Enzyme Levels. In: Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems, 236-310. Hrg.: M. Rechigl, Jr., Baltimore University Park Press
- Reynolds, E.S. (1963): The Use Of Lead Citrate At High pH As An Electron Opaque Stain In Electron Microscopy. J. Cell. Biol. 17, 208-212
- Robertson, J.J., Halvorson, H.O. (1957): The Components Of Maltozymase In Yeast, And Their Behavior During Deadaptation. J. Bacteriol. 73, 186-198
- Roggenkamp, R., Sahm, H., Wagner, F. (1974): Microbial Assimilation Of Methanol. Induction And Function Of Catalase In *Candida boidinii*. FEBS Lett. 41, 283-286
- Roggenkamp, R. (1976): Mikrobodies In Der Methanol Verwertenden Hefe *Candida boidinii*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Rose, Z.B., Racker, E. (1962): Formaldehyd Dehydrogenase from Bakers' Yeast. J. Biol. Chem. 237, 3279-3281

- Saheki, T., Holzer, H. (1974): Comparisons of the Tryptophan Synthase Inactivating Enzymes with Proteinases from Yeast. *Eur. J. Biochem.* 42, 621-626
- Saheki, T., Matsuda, Y., Holzer, H. (1974): Purification and Characterization of Macromolecular Inhibitors of Proteinase A from Yeast. *Eur. J. Biochem.* 47, 325-332
- Saheki, T., Holzer, H. (1975): Proteolytic Activities in Yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 384, 203-214
- Sahm, H., Wagner, F. (1972): Mikrobielle Verwertung von Methanol. Isolierung und Charakterisierung der Hefe *Candida boidinii*. *Arch. Microbiol.* 84, 29-42
- Sahm, H., Wagner, F. (1973 a): Microbial Assimilation of Methanol. The Ethanol- and Methanol-Oxidizing Enzymes of the Yeast *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* 36, 250-256
- Sahm, H., Wagner, F. (1973 b): Mikrobielle Verwertung von Methanol. Eigenschaften der Formaldehyddehydrogenase und der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*. *Arch. Mikrobiol.* 90, 263-268
- Sahm, H., Roggenkamp, R., Wagner, F., Hinkelmann, W. (1975): Microbodies in the Methanol-grown *Candida boidinii*. *J. Gen. Microbiol.* 88, 218-222
- Sahm, H. (1977): Metabolism of Methanol by Yeast. *Adv. Biochem. Engineering* 6, 77-103
- Schimke, T., Doyle, D. (1970): Control Of Enzyme Levels In Animal Tissues. *Ann. Rev. Biochem.* 39, 929-976
- Schimke, R.T. (1973): Control in Enzyme Levels in Mammalian Tissues. *Adv. Enzymol.* 37, 135-187
- Schoenheimer, R. (1942): The dynamic state of body constituents. Harvard University Press, Cambridge

- Schött, E.H., Holzer, H. (1974): Purification and Some Properties of Tryptophan Synthase Inactivase II from Yeast. Eur. J. Biochem. 42, 61-66
- Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H., Kula, M.-R. (1976): Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem. 62, 151-160
- Siepen, D., Yu, P.H., Kula, M.-R. (1975): Proteolytic Enzymes of *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem. 56, 271-281
- Siepen, D., Kula, M.-R. (1976): Specificity Of Five Intracellular Proteinases Of *Neurospora crassa*. FEBS Lett. 66, 31-34
- Slater, E.C. (1967): Application of Inhibitors and Uncouplers for a Study of Oxidative Phosphorylation. In: Methods in Enzymology X. 48-57. Hrg.: Estabrook, R.W., Pullman, M.E., Academic Press, New York, London
- Sorger, G.J., Debanne, M.T., Davies, J. (1974): Effect of Nitrate on the Synthesis and Decay of Nitrate Reductase of *Neurospora*. Biochem. J. 140, 395-403
- Spiegelmann, S., Reiner, J.M. (1947): The Formation And Stabilization Of An Adaptive Enzyme In The Absence Of Its Substrate. J. Gen. Physiol. New York 31, 175-193
- Spurr, A. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruc. Res. 26, 31-46
- Stadtman, E.R. (1966): Allosteric Regulation Of Enzyme Activity. Adv. Enzymol. 28, 41-154
- Switzer, R.L. (1977): The Inactivation Of Microbial Enzymes In Vivo. Ann. Rev. Microbiol. 31, 135-157

- Tanaka, A., Yasuhara, S., Kawamoto, S., Fukui, S., Osumi, M. (1976): Development of Microbodies in the Yeast *Kloeckera* Growing on Methanol. J. Bacteriol. 126, 919-925
- Tang, J. (1976): Pepsin and pepsinogen: models for carboxyl (acid) proteases and their zymogen. Trends in Biochemical Sciences 1, 205-208
- Tani, Y., Miya, T., Ogata, K. (1972): The Microbial Metabolism of Methanol. Part II. Properties of Crystalline Alcohol Oxidase from *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem. 36, 76-83
- Thoma, J.A., Spradlin, J.E., Dygert, S. (1971): Plant and Animal Amylases. In: The Enzymes 5, 115-189. Hrg.: Boyer, P.D., Academic Press
- Thomas, D.A., Wright, B.E. (1976): Glycogen Phosphorylase in *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 251, 1258-1263
- Thurston, C.F., John, P.C.L., Syrett, P.J. (1973): The Effect of Metabolic Inhibitors on the Loss of Isocitrate Lyase Activity from *Chlorella*. Arch. Microbiol. 88, 135-145
- Tsai, H., Tsai, J.H.J., Yu, P.H. (1973): Effects of Yeast Proteinase and Its Inhibitors on the Inactivation of Tryptophan Synthase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem. 40, 225-232
- Ulane, R.E., Cabib, E. (1976): The Activating System of Chitin Synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification And Properties Of The Activating Factor. J. Biol. Chem. 251, 3367-3374
- Veenhuis, M., van Dijken, J.P., Harder, W. (1976): Cytochemical Studies on the Localisation of Methanol Oxidase and Other Oxidases in Peroxisomes of Methanol-Grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol. 111, 123-135

- Veenhuis, M., Zwart, K., Harder, W. (1978): Degradation Of Peroxisomes After Transfer Of Methanol-Grown *Hansenula Polymorpha* Into Glucose-Containing Media. FEMS Microbiol. Lett. 3, 21-28
- Waindle, L.M., Switzer, R.L. (1973): Inactivation of Aspartic Transcarbamylase in Sporulating *Bacillus subtilis*: Demonstration of a Requirement for Metabolic Energy. J. Bacteriol. 114, 517-527
- Waites, M.J., Quayle, J.R. (1980): Dihydroxyacetone: a Product of Xylulose 5-Phosphate-dependent Fixation of Formaldehyde by Methanol-grown *Candida boidinii*. J. Gen. Microbiol. 118, 321-327
- Webb, J.L. (1966): Enzyme and Metabolic Inhibitors II. Academic Press, New York, London
- Wolf, D.H., Ehmann, C. (1979): Studies on a Proteinase B Mutant of Yeast, Eur. J. Biochem. 98, 375-384
- Wolf, H.D., Holzer, H. (1979): Proteolysis in Yeast. In: Transport and Utilization of Amino Acids, Peptides and Proteins by Microorganisms. Hrg.: Payne, J.W., John Wiley and Sons, Chichester. Im Druck
- Wolf, D.H. (1980 a): Control of Metabolism in Yeast and Lower Eukaryotes Through Action of Proteinases. In: Advances in Microbial Physiology XXI. Hrg.: Rose, A.H., Morris, J.G., Academic Press, London, New York. Im Druck
- Wolf, D.H. (1980 b): Proteinases And Sporulation In Yeast. In: Proceedings of the Third International Fungal Spore Symposium. Hrg.: Turian, G., Hohl, H.R., Academic Press, London, New York. Im Druck
- Yasuhara, S., Kawamoto, S., Tanaka, A., Osumi, M., Fukui, S. (1976): Induction of Catalase Activity in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem. 40, 1771-1780

- Zubenko, G.S., Jones, E.W. (1979): Catabolite inactivation of gluconeogenic enzymes in mutant of yeast deficient in proteinase B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4581-4585
- Zubenko, G.S., Mitchell, A.P., Jones, E.W. (1979): Septum formation, cell division, and sporulation in mutant deficient in proteinase B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2395-2399

Lebenslauf

- | | |
|-------------|--|
| 12. 3. 1953 | geboren in Bad Nenndorf |
| 1959 - 1963 | Besuch der Grundschule in Bad Nenndorf |
| 1963 - 1971 | Besuch des Gymnasiums Bad Nenndorf und Abitur |
| 1971 - 1973 | Studium der Biologie an der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster |
| 1973 - 1977 | Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig |
| April 1974 | Diplom-Biologen-Vorprüfung |
| Juni 1977 | Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Allgemeine Biochemie,
Physikalische Chemie |
| 1977 - 1980 | Arbeit an vorliegender Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Sahm am Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich GmbH |

